



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Estudio in vivo de la actividad moduladora del  
fucoïdan de Lessonia trabeculata Villouta & Santelices  
(1986) sobre parámetros de la inmunidad innata y  
humoral**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo**

**AUTOR**

**Carlos Andrés OROYA LAZO**

**ASESOR**

**Dra. Libertad ALZAMORA GONZALES**

**Lima, Perú**

**2019**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Oroya, C. (2019). *Estudio in vivo de la actividad moduladora del fucoidan de Lessonia trabeculata Villouta & Santelices (1986) sobre parámetros de la inmunidad innata y humoral*. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## METADATOS

Código ORCID del autor: 0000-0002-9012-3041

Código ORCID del asesor: 0000-0002-7425-7453

DNI del autor: 73140192

Grupo de investigación: MODULANS

Instituto que financia parcial o totalmente la investigación:

Proyecto Innovate: “Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoidan de algas pardas como suplementos nutricionales para humanos”. Convenio N°143-PNICP-PIAP-2015.

Proyecto de Investigación B18100301 del G.I. “Inmunomoduladores y antitumorales de origen natural y sintético” financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM.

Programa de promoción de tesis de pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM. Código del proyecto: B18101214 aprobado mediante resolución rectoral N° 05969-R-18.

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación: Ciudad Universitaria de la UNMSM. Calle Germán Amézaga N° 375 – Edificio Jorge Basadre, Ciudad Universitaria, Lima.

Coordenadas geográficas: 12°03'30''S 77°05'00''O

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2017-2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 14:10 horas del 24 de mayo de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de CARLOS ANDRÉS OROYA LAZO.

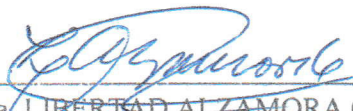
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 009-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: "ESTUDIO *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD MODULADORA DEL FUCOIDAN DE *Lessonia trabeculata* VILLOUTA & SANTELICES (1986) SOBRE PARÁMETROS DE LA INMUNIDAD INNATA Y HUMORAL" y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con méritos honros.


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo a CARLOS ANDRÉS OROYA LAZO y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

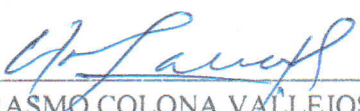
Siendo las 15:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 24 de mayo de 2019.

  
Mg. FERNANDO RETUERTO PRIETO  
(PRESIDENTE)

  
Dra. LIBERTAD ALZAMORA GONZALES  
(ASESORA)

  
Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA  
(MIEMBRO)

  
Mg. ERASMO COLONA VALLEJOS  
(MIEMBRO)

**(ACTA DE SUSTENTACIÓN)**

Se incluirá el formato del acta de sustentación, en blanco.

El presente estudio es parte del Proyecto: “Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoïdan de algas pardas como suplementos nutricionales para humanos”. Convenio N°143-PNICP-PIAP-2015, y del Proyecto de Investigación B18100301 del G.I. “Inmunomoduladores y antitumorales de origen natural y sintético” financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM.

La tesis ha sido parcialmente financiada por el programa de promoción de tesis de pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM. Código del proyecto: B18101214 aprobado mediante resolución rectoral N° 05969-R-18.



## **Dedicatoria**

Le dedico esta investigación a toda mi familia. A mis padres, mis primeros amigos, que me han brindado su apoyo toda mi vida, haciendo grandes sacrificios y lo posible para que cada cosa que he anhelado se haga realidad, desde lo artístico hasta lo académico. A mis hermanos, quienes me han ayudado de diferentes maneras, cuidándome desde que he sido pequeño, con la misma garra que mis padres. Y al resto de mi familia, aquí y en otros países, quienes de una u otra forma me han ayudado a seguir por este camino de la ciencia que tanto me apasiona, y por toda su fe que han depositado en mí. Son la prueba que la distancia no importa. Y, por último, a mis mascotas Negra y Pinina, miembros leales e importantes de nuestra familia quienes nos reciben y alegran cada día desde ya hace muchos años. A todos los mencionados, este trabajo es producto de aquello que más me apasiona en este momento de mi vida, este trabajo es para ustedes, una de las primeras muestras de mi realización como profesional, y más importante aún, como persona, conociendo los sacrificios que he hecho y cuanto he crecido.

Además, esta tesis me ha servido para aprender lo fuerte que un científico debe ser, perseverante, paciente, flexible, sereno, tolerante y apasionado; y por eso también se lo dedico a todo aquel que se ha sentido frustrado, para que recuerde que está en camino al éxito. Se publican resultados, pero no todo lo que uno ha pasado para obtenerlos. No pierdan la fe.

## **Agradecimientos**

A mi familia por su eterno apoyo incondicional.

A mi asesora, la profesora Libertad Alzamora, por la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, asesoría y constante apoyo en mi desarrollo como profesional y como persona

Al profesor Erasmo Colona por sus sabios consejos y guía.

A mis compañeros y colegas de laboratorio: Dora, Mónica, Ricardo, Mary, Rosa, Mauro y Jorge.

A Sofía y Liz, junto a sus amigos de veterinaria, al profesor Juan Jiménez, y finalmente a mis amigos de la base 13 de Genética y Biotecnología quienes me apoyaron de diferentes formas en todos estos años, sobre todo a María Gracia, Mac y Diego, mis mejores amigos.

# ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
II.1. Respuesta inmune.....	3
II.1.1. Respuesta inmune innata.....	3
II.1.2. Respuesta inmune adaptativa.....	5
II.2. <i>Lessonia trabeculata</i> .....	12
II.3. Inmunomoduladores.....	13
II.3.1. El fucoidan como inmunomodulador.....	14
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
IV.1. Material Biológico.....	19

<b>IV.2. Protocolo de tratamiento e inmunización.....</b>	<b>19</b>
<b>IV.3. Disección, obtención de macrófagos, esplenocitos y suero.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.4 Producción de especies reactivas de oxígeno o estallido respiratorio por macrófagos peritoneales.....</b>	<b>23</b>
<b>IV.5 Producción de especies reactivas de nitrógeno.....</b>	<b>24</b>
<b>IV.6 Fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales.....</b>	<b>25</b>
<b>IV.7 Titulación de anticuerpos anti-GRC por hemaglutinación.....</b>	<b>26</b>
<b>IV.8 Detección de IL-10 en suero por inmunoensayo enzimático (ELISA).....</b>	<b>27</b>
<b>IV.9 Expresión génica transcripcional para citoquinas de respuesta humoral producidas por esplenocitos.....</b>	<b>28</b>
<b>IV.9.1 Generación del cDNA.....</b>	<b>28</b>
<b>IV.9.2 Análisis de expresión de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.10 Análisis Estadístico.....</b>	<b>31</b>
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>V.1. Producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos peritoneales.....</b>	<b>32</b>
<b>V.2. Producción de especies reactivas de nitrógeno por macrófagos peritoneales .....</b>	<b>33</b>

V.3. Efecto del fucoïdan sobre la fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales en la respuesta inmune secundaria.....	34
V.4. Efecto del fucoïdan sobre el título de anticuerpos anti-GRC.....	35
V.5. Efecto del tratamiento con fucoïdan en la producción de IL-10 en suero.....	36
V.6. Expresión génica transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 en esplenocitos.....	37
VI. DISCUSIÓN.....	40
VII. CONCLUSIONES.....	53
VIII. RECOMENDACIONES.....	54
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
X. ANEXOS.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ag: Antígeno	LT: linfocito T
APC: célula presentadora de antígeno	MHC: complejo mayor de
BCR: receptor de célula B	histocompatibilidad
D.O.: densidad óptica	min: minuto
DC: célula dendrítica	NBT: nitroazul de tetrazolio
ERN: especies reactivas de nitrógeno	NK: asesina natural
ERO: especies reactivas de oxígeno	NO: óxido nítrico
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato	NO <sub>2</sub> : nitrito
deshidrogenasa	O <sup>2-</sup> : anión superóxido
G1: grupo tratado con fucoidan de <i>Lessonia</i>	p.c.: peso corporal
<i>trabeculata</i> con dosis 5 mg/kg p.c.	PAMP: patrones moleculares asociados a
G2: grupo tratado con fucoidan de <i>Lessonia</i>	patógeno
<i>trabeculata</i> con dosis 10 mg/kg p.c.	PMA: forbol miristato acetato
G3: grupo tratado con fucoidan de <i>Fucus</i>	RIP: respuesta inmune primaria
<i>vesiculosus</i> con dosis 5 mg/kg p.c.	RIS: respuesta inmune secundaria
G4: grupo tratado con solución salina (0.9%)	rpm: revoluciones por minuto
GRC: glóbulos rojos de carnero	RT-PCR: retro transcripción seguida de
i.p.: intraperitoneal	reacción en cadena de la polimerasa
IgG: inmunoglobulina G	s: segundo
IL: interleuquina	Tc: linfocito T citotóxico
iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible	TCR: receptor de célula T
LB: linfocito B	Th: linfocito T cooperador
LPS: lipopolisacárido	

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Características de las citoquinas producidas por Th2.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *L. trabeculata*.

**Tabla 3.** *Primers* utilizados para el análisis de expresión génica transcripcional para citoquinas de respuesta humoral producidas por esplenocitos.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Producción de ERO y NO por células fagocíticas.

**Figura 2.** Activación de linfocito B independiente de T.

**Figura 3.** Activación de Linfocito T y generación de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores.

**Figura 4.** Activación de linfocitos B dependiente de T y generación de células plasmáticas productoras de IgG.

**Figura 5.** Fagocitosis mediada por anticuerpos.

**Figura 6.** Fucoidan de *L. trabeculata* antes de su resuspensión con solución salina.

**Figura 7.** Tratamiento y condiciones de cuidado de ratón.

**Figura 8.** Flujograma de tratamiento de los grupos.

**Figura 9.** Obtención de células inmunes.

**Figura 10.** Suero de ratones separado en *microtainer* con gel separador.

**Figura 11.** Producción de especies reactivas de oxígeno o estallido respiratorio por macrófagos peritoneales.

**Figura 12.** Producción de especies reactivas de nitrógeno.

**Figura 13.** Titulación de anticuerpos anti-GRC por hemaglutinación.

**Figura 14.** Detección de IL-10 en suero por ELISA.

**Figura 15.** Producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos peritoneales.

**Figura 16.** Producción de especies reactivas de nitrógeno por macrófagos peritoneales.

**Figura 17.** Fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales.

**Figura 18.** Fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales en la respuesta inmune secundaria.

**Figura 19.** Título de anticuerpos séricos hemaglutinantes anti-GRC.

**Figura 20.** Producción de IL-10 en suero.

**Figura 21.** Expresión génica transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por esplenocitos en la Respuesta Inmune Primaria y Secundaria.



## RESUMEN

El fucoïdan es un polisacárido sulfatado presente en distintas algas pardas, cuya composición química varía entre especies y se ha demostrado que posee propiedades innumonoduladoras.

*L. trabeculata* es una alga parda cuyo fucoïdan cuenta con escasos estudios, por ello el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto innumomodulador del fucoïdan de *Lessonia trabeculata* en un modelo murino.

Se trataron ratones por vía oral con fucoïdan de *L.trabeculata* y se inmunizaron con glóbulos rojos de carnero (GRC). Un grupo de ratones recibió una dosis de 5 y otro, de 10 mg/kg p.c. Se emplearon 2 grupos controles: uno fue tratado con fucoïdan de *Fucus vesiculosus* a la dosis de 5 mg/kg p.c. y otro, con solución salina (0.9%). En los 4 grupos se evaluó tanto la respuesta inmune primaria, como la secundaria. Concluidos los tratamientos se extrajeron los macrófagos peritoneales para evaluar parámetros de la inmunidad innata: Especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN) y fagocitosis; y parámetros de la inmunidad humoral: presencia de anticuerpos hemaglutinantes (IgM) y opsonizantes (IgG). Los resultados obtenidos para los citados parámetros fueron contrastados con la presencia de mRNA transcripcional para IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 en esplenocitos. Adicionalmente se determinó la presencia de IL-10 sérico por ELISA.

Los resultados indican que el fucoïdan puede aumentar la producción de ERO en la respuesta inmune primaria (RIP), no detectándose diferencias en la respuesta inmune secundaria (RIS). La producción de ERN aumentó de forma dosis dependiente en la RIP y RIS. La fagocitosis mediada por anticuerpos en la RIS aumentó significativamente solo en el grupo tratado con fucoïdan de *L. trabeculata* con dosis 10 mg/kg p.c. También se observó que la expresión transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por esplenocitos fue modulada y dependiente del tratamiento, dosis y

tipo de respuesta inmune. En contraste, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre *L.trabeculata* y *F.vesiculosus*, y dosis en la producción de hemaglutininas anti-GRC, ni en la concentración de IL-10 en suero.

Se concluye que el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata* por vía oral en ratones inmunizados posee capacidad de estimular diferentes parámetros inmunes como la producción de ERO y ERN, fagocitosis mediada por anticuerpos y expresión transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

**Palabras clave:** Fucoïdan, *Lessonia trabeculata*, inmunomodulador, respuesta inmune innata, respuesta inmune adaptativa humoral.

## ABSTRACT

Fucoidan is a sulfated polysaccharide present in different brown algae, whose chemical composition varies between species and has been shown to possess immunomodulatory properties.

*Lessonia trabeculata* is a brown seaweed whose fucoidan has few studies, so the objective of this work was to evaluate the immunomodulatory effect of the fucoidan of *L. trabeculata* in a murine model.

Mice were treated orally with fucoidan from *L. trabeculata* and immunized with sheep red blood cells (SRBC). One group of mice received a dose of 5 and another, 10 mg / kg p.c. Two control groups were used: one was treated with fucoidan from *Fucus vesiculosus* at a dose of 5 mg / kg p.c. and another, with saline solution (0.9%). In the 4 groups, both the primary and secondary immune response were evaluated. After the treatments, peritoneal macrophages were extracted to evaluate innate immunity parameters: Reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS) and phagocytosis; and parameters of humoral immunity: presence of haemagglutinins (IgM) and opsonins (IgG) antibodies. The results for the mentioned parameters were contrasted with the presence of mRNA of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10 in splenocytes. Additionally, the presence of seric IL-10 was determined by ELISA.

The results indicate *L. trabeculata* fucoidan can increase ROS production during primary immune response (PIR), with no differences detected during secondary immune response (SIR). RNS production increased in a dose-dependent manner during PIR and SIR. Facilitated phagocytosis during SIR increased significantly only in the group treated with fucoidan of *L. trabeculata* at a dose of 10 mg/kg p.c. It was also observed that transcriptional expression of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10 by splenocytes was modulated and dependent on the treatment, dose and

type of immune response. In contrast, no statistically significant differences were found between *L.trabeculata* and *F.vesiculosus* and doses in anti-SRBC hemagglutinins production, nor serum IL-10 concentration.

It is concluded that the oral treatment with fucoidan of *L. trabeculata* in immunized mice has the capacity to stimulate different immune parameters such as the production of ROS and RNS, facilitated phagocytosis and transcriptional expression of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10.

**Key words:** Fucoidan, *Lessonia trabeculata*, immunomodulator, innate immune response, humoral adaptive immune response.

## I. INTRODUCCIÓN

El correcto funcionamiento del sistema inmune confiere al individuo distintos mecanismos de defensa contra factores externos e internos permitiendo la conservación de su homeostasis (Abbas *et al.*, 2014). En la actualidad se han descrito una gran variedad de problemas en el sistema inmunitario que aparecen a lo largo de la vida, las causas son diversas y ocurren con frecuencia en la población (Bousfiha *et al.*, 2013; Sausa, 2014; Chinen y Shearer, 2010; Abbas *et al.*, 2014; Council *et al.*, 1992).

Un inmunomodulador es una sustancia que regula algún aspecto de la respuesta inmune, sea innato o adaptativo, humoral o celular, y por ello tiene alto potencial aplicativo. Tienen diferente origen y algunos ya son aplicados luego de haber sido exhaustivamente evaluados en etapas preclínicas y clínicas (Craig *et al.*, 2004; Jantan *et al.*, 2015; Abood, 2017). Sin embargo, el uso de estos puede tener efectos secundarios, por lo que se evalúan incesantemente otras alternativas, principalmente de origen natural, que minimicen los efectos no deseados (Bascones *et al.*, 2014).

Las algas pardas marinas presentan un polisacárido sulfatado denominado fucoidan con propiedades inmunomoduladoras. No obstante, la composición de este polisacárido es heterogénea entre especies e inclusive depende de las estaciones (Skriptsova *et al.*, 2015; Fletcher *et al.*, 2017) y por ello su efecto en la respuesta inmune puede variar.

*Lessonia trabeculata* (Villouta y Santelices, 1986) es un alga parda que crece en la región submareal, desde Ancash, Perú hasta Chile (Zavala *et al.*, 2015), se la ha utilizado principalmente para la obtención de alginatos (Caja *et al.*, 2004) y como producto para la industria alimentaria (Quitral *et al.*, 2012; Gatlin, 2007). Por lo que es considerado un importante recurso biológico de uso industrial.

Los pocos estudios del fucoïdan de *L. trabeculata* sobre la respuesta inmune (Colona *et al.*, 2015) y los antecedentes de la capacidad inmunomoduladora del fucoïdan de otras algas pardas sugieren que no se aprovecha adecuadamente un importante recurso con potencial inmunomodulador útil en la salud humana; por lo cual se hace imprescindible realizar estudios preclínicos en un modelo animal saludable que permita extrapolar los resultados a organismos en condiciones patológicas.

Los resultados en este trabajo sentarán las bases para estudios posteriores y su aplicación en condiciones tanto normales como patológicas, por ejemplo, se podría emplear como tratamiento complementario a la vacunación optimizando la seroconversión.

Además de su potencial utilización, los conocimientos generados permitirán darle un valor agregado al consumo del fucoïdan como parte de la dieta impulsando la industria basada en esta alga y revalorizando este recurso biológico de nuestro mar; también servirán de sustento para promover el cultivo *in vitro* de *L. trabeculata*, de manera que se reduzca la extracción de su hábitat natural, actualmente regulado por el Instituto del Mar del Perú; y la metodología propuesta también podrá ser utilizada como modelo para evaluar parámetros inmunológicos con el fucoïdan obtenido de las algas cultivadas *in vitro*.

En el presente estudio el objetivo fue evaluar la actividad moduladora del fucoïdan extraído de *Lessonia trabeculata* sobre parámetros de la inmunidad innata celular y adaptativa humoral en ratones inmunizados con glóbulos rojos de carnero.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Respuesta inmune

La respuesta inmune es la acción coordinada de componentes celulares y moleculares de un organismo con el fin de defenderlo frente a la exposición de partículas consideradas extrañas, denominadas antígenos (Ag). Esta respuesta es clásicamente dividida en respuesta inmune innata o adaptativa, de tipo celular o humoral (Abbas *et al.*, 2014).

#### II.1.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa del organismo. Posee mecanismos que reconocen estructuras comunes en microbios y células dañadas. No genera memoria inmunológica y por ello, no es modificada directamente ante diferentes exposiciones al mismo Ag. En este tipo de respuesta participan células tisulares como los macrófagos y DCs (Abbas *et al.*, 2014). Estas células pueden ingerir o fagocitar al Ag a través de sus receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP). Ejemplos de estos receptores son: los de tipo Toll (TLR), NOD, RIG-1, para manosa y dectina 1 (Hirayama *et al.*, 2017). Además, pueden fagocitar partículas que no generen señales inhibitorias de la fagocitosis, como la interacción CD47-SIRPα (Barclay *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2015).

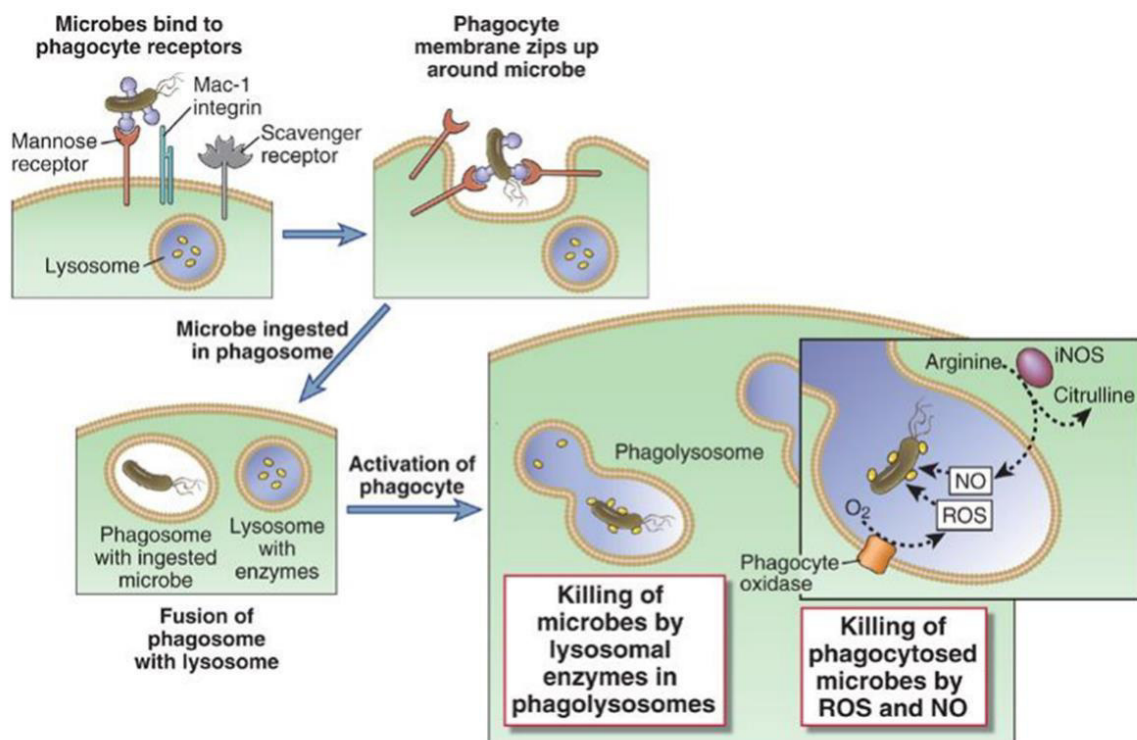
Posterior al reconocimiento, los fagocitos forman el fagolisosoma como compartimiento intracelular para el Ag. En este compartimiento el Ag será destruido mediante la **producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)** (Figura 1) (Abbas *et al.*, 2014). Estos 2 mecanismos se complementan durante la respuesta del macrófago (Vazquez *et al.*, 2000).

La producción de ERO en estas células depende de la NADPH oxidasa, la cual es un complejo de 5 subunidades que se ensamblan en la membrana lipídica del fagosoma en

células activadas generando anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), un precursor de las ERO. Las ERO causan daño oxidativo en las partículas ingeridas mediando su destrucción (Arango *et al.*, 2010).

Los macrófagos activados pueden producir ERN mediante la enzima sintasa de óxido nítrico inducida (iNOS). Esta enzima cataliza la producción óxido nítrico (NO), el cual es un precursor de las ERN, altamente difusible, capaz de atravesar la membrana plasmática y cumplir diferentes funciones.

Este compuesto es inestable y difícil de medir. No obstante su forma oxidada, el nitrito ( $NO_2$ ), es más estable y puede ser medible (Dhawan, 2014).



**Figura 1. Producción de ERO y ERN por células fagocíticas.** El Ag reconocido es ingerido y destruido por las ERO y ERN dentro del fagolisosoma (Abbas *et al.*, 2014).



### **II.1.2. Respuesta inmune adaptativa**

Después de la activación de los componentes de la respuesta inmune innata y ante la presencia del Ag, se origina la respuesta inmune adaptativa que posee mayor especificidad, cuya intensidad y eficacia es mayor con las subsecuentes exposiciones debido a la generación de memoria inmunológica. Esta respuesta, que es dependiente de linfocitos, representa la siguiente línea de defensa por la cual el Ag suele ser eliminado del organismo (Abbas *et al.*, 2014).

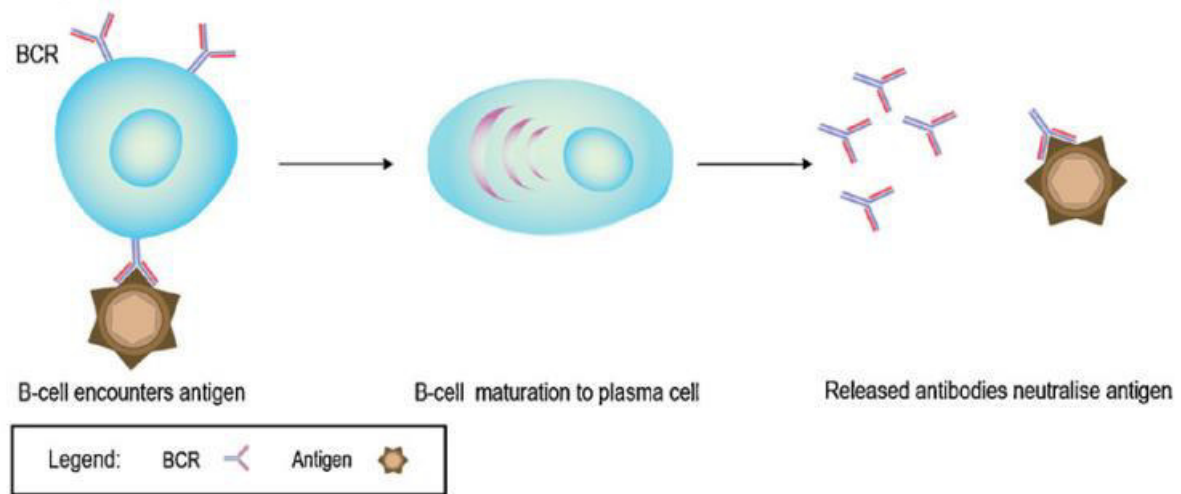
#### ***II.1.2.1. Respuesta inmune primaria (RIP)***

Durante la primera exposición del organismo al Ag, o también denominada respuesta inmune primaria (RIP), se inicia la activación de LB y LT, y consecuentemente el desarrollo de memoria inmunológica.

**La respuesta inmune adaptativa humoral** tiene como eje principal a los LB. Los LB vírgenes se encuentran con el Ag específico en los órganos linfoides secundarios, como el bazo y ganglios linfáticos. Aquellos LB con receptores (BCR) capaces de reconocer al Ag son activados, lo que ocasiona su expansión clonal y diferenciación a células de memoria y productoras de anticuerpos. Estas últimas son conocidas como células plasmáticas. Los anticuerpos son proteínas solubles con la misma especificidad del BCR de la célula que los produjo y por ello, también son capaces de reconocer al Ag (Figura 2) (Abbas *et al.*, 2014; Moser y Leo, 2010). La cantidad de anticuerpos específicos para el Ag en el plasma llega a ser máxima cerca a las 2-3 primeras semanas después de la exposición al Ag (Leenaars y Hendriksen, 2005).

Durante una RIP, el isotipo de anticuerpo específico al Ag predominante en suero es la IgM, que puede ser detectada por su capacidad de aglutinar Ags particulados debido a su estructura pentamérica. La producción de este isotipo puede ser independiente de LT, por lo que se pueden producir anticuerpos contra epítopes proteínicos y no proteínicos. Es importante

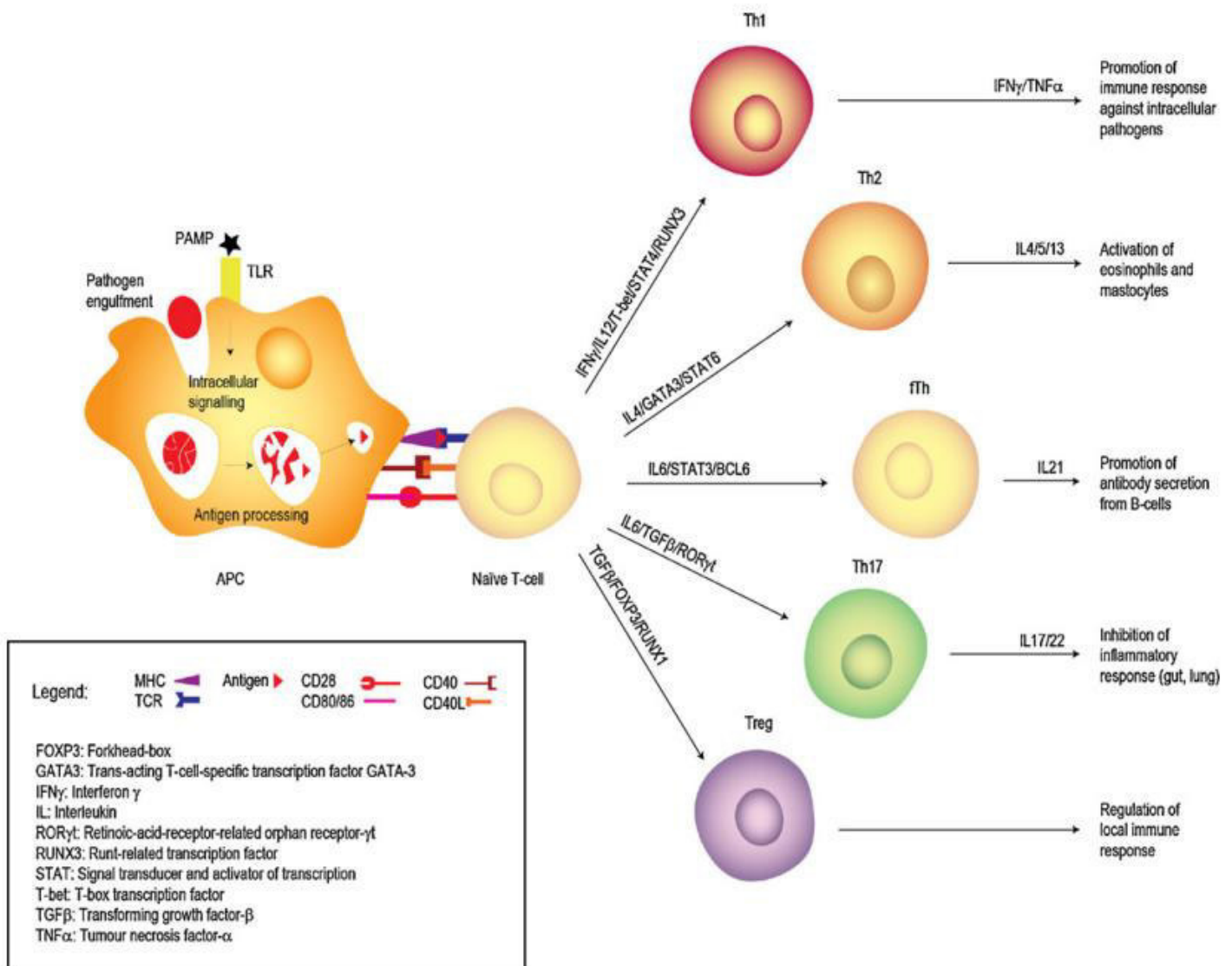
agregar que la activación de LB no solo requiere la unión del Ag al BCR, sino también de otras moléculas coestimuladoras. Como por ejemplo la unión de fragmentos de proteínas de complemento sobre el Ag a sus respectivos receptores ubicados en LB o el reconocimiento de patrones moleculares mediante receptores, como por ejemplo los TLR (Abbas *et al.*, 2014).



**Figura 2. Activación de linfocito B independiente de T.** Los LB reconocen al Ag y su maduración a célula plasmática no requiere de LT (Moser y Leo, 2010).

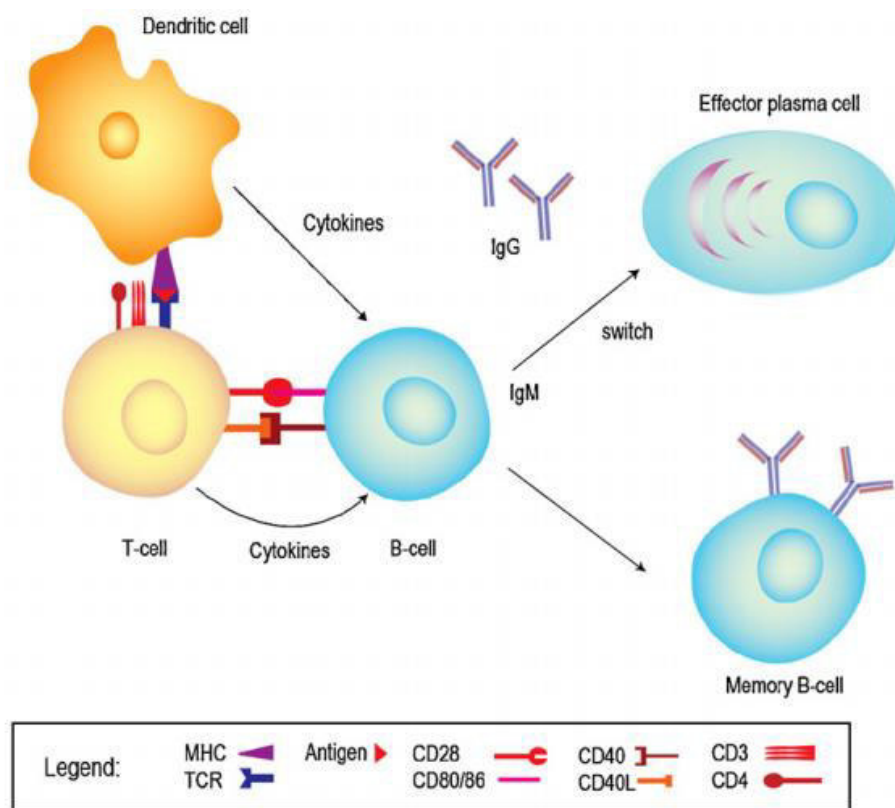
Paralelamente a la activación de los LB, ocurre la activación de los LT. Este proceso requiere de células presentadoras de Ag especializadas (APC), como las DCs, las cuales son capaces de reconocer, fagocitar, procesar y presentar péptidos derivados del Ag y unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a los LT vírgenes con receptores (TCR) específicos para el complejo péptido-MHC (pMHC). Esta interacción, pMHC-TCR, acompañada con la estimulación de receptores coestimuladores y citoquinas lleva a la activación del LT virgen generando LT efectores, lo cual induce cambios fenotípicos y funcionales (Figura 3) (Abbas *et al.*, 2014; Moser y Leo, 2010).

Los LT pueden clasificarse por la presencia del receptor coestimulador CD4 o CD8, también son conocidos como LT cooperadores (Th) o citotóxicos (Tc), respectivamente. Los Th poseen la capacidad de regular las funciones de otras células como macrófagos, LB, entre otras, mediante citoquinas o interleuquinas (IL) (Abbas *et al.*, 2014). La expresión de un grupo de citoquinas es uno de los criterios que se utiliza para subdividir a las poblaciones de Th generados. Este perfil de citoquinas depende de las señales dadas por la APC, y esta a su vez depende del Ag. Existen subpoblaciones ya caracterizadas asociadas que estimulan o inhiben ciertas respuestas inmunes (Figura 3) (Abbas *et al.*, 2014; Moser y Leo, 2010).



**Figura 3. Activación de Linfocito T y generación de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Moser y Leo, 2010).**

Los LB específicos al Ag tienen la capacidad de cambiar el isotipo del anticuerpo producido inicialmente, por ejemplo: de IgM a IgG. Este proceso requiere la participación de Th y se pueden generar, por ejemplo, células plasmáticas productoras del IgG (Figura 4) (Abbas *et al.*, 2014; Moser y Leo, 2010). La producción de este isotipo específico al Ag predomina en una segunda exposición al Ag respectivo, lo que es una respuesta inmune secundaria (RIS). El cambio de isotipo es influenciado por las citoquinas producidas por los Th, y se pueden utilizar para clasificar a los Th. Existen 2 subpoblaciones de Th muy bien descritas: Th1 y Th2 (Abbas *et al.*, 2014).



**Figura 4. Activación de linfocitos B dependiente de T y generación de células plasmáticas productoras de IgG (Moser y Leo, 2010).**

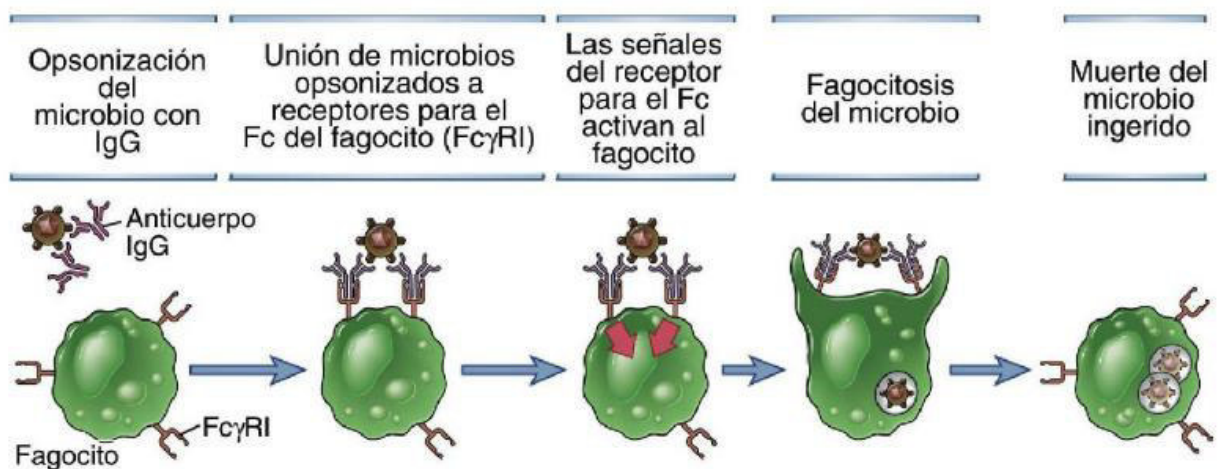
Los Th1 son conocidos por producir citoquinas, como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), que **estimulan la respuesta de tipo celular**, así como la capacidad destructiva de los macrófagos, sin excluir su contribución en la respuesta humoral,

por ejemplo en la producción de IgG2a en ratones (Owen *et al.*, 2013). Por otro lado, los Th2 son conocidos por producir citoquinas, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que **estimulan la respuesta de tipo humoral**, como por ejemplo el cambio de isotipo a IgG1 en ratón en los centros germinales en los órganos linfoides secundarios como el bazo (Owen *et al.*, 2013; Rojas *et al.*, 2012). La expresión de estas citoquinas puede ser evaluada a nivel transcripcional y traduccional mediante RT-PCR y ELISA, respectivamente (Ulett *et al.*, 2000; Małaczewska, 2014). Las funciones de estas citoquinas se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características de las citoquinas producidas por Th2.**

<b>Citoquina</b>	<b>Función</b>	<b>Fuente</b>	<b>Célula diana</b>	<b>Referencias</b>
IL-4	Generación de Th2, factor de supervivencia de LB y LT, estimulación de la expresión de MHCII, secreción de IgG1 e IgE e inducción de la producción de citoquinas anti-inflamatorias	Th2, basófilos, eosinófilos, mastocitos, NKT y células T $\gamma\delta$	Macrófagos, mastocitos, LB y LT	Akdis <i>et al.</i> , 2016; Vazquez <i>et al.</i> , 2015; Abbas <i>et al.</i> , 2014
IL-5	Diferenciación y función de células mieloides, mantenimiento de secreción de IgE, e importante en la producción de anticuerpos IgG.	Th2, eosinófilos y mastocitos activados, células T $\gamma\delta$ , NK y NKT	Eosinófilos, basófilos, mastocitos, neutrófilos, monocitos y Th reg,	Akdis <i>et al.</i> , 2016; Grund <i>et al.</i> , 2012; Strestik <i>et al.</i> , 2001; Owen <i>et al.</i> , 2013.
IL-6	Activación y tráfico leucocitario, activación y diferenciación de LT y LB, producción de IgG, IgM e IgA, e inflamación.	Células endoteliales y de músculo liso, fibroblastos, granulocitos monocitos, macrófagos, LB y LT.	Hepatocitos, leucocitos, LB y LT, células hematopoyéticas	Akdis <i>et al.</i> , 2016; Vazquez <i>et al.</i> , 2015.
IL-10	Regulación de la respuesta inmune, supresión de IgE e inducción de IgG e IgM; generación de centros germinales.	LB y LT, monocitos, macrófagos y DCs.	Macrófagos, monocitos, granulocitos, DCs, NK, LB y LT.	Akdis <i>et al.</i> , 2016; Guthmiller <i>et al.</i> , 2016; Itoh <i>et al.</i> , 1994

La producción de IgG requiere la participación de células y citoquinas, se inicia en la RIP, y predomina sobre la IgM en suero en la RIS. Este isotipo puede reconocer y recubrir al Ag (opsonizar), facilitando su reconocimiento por células que posean receptores para la porción Fc de la cadena gamma de la IgG (FcγR). La IgG puede estar unida al FcγR, que se expresa en la superficie de los macrófagos. La fagocitosis por estas células es estimulada mediante señales por el FcγR, intensificándose por el agrupamiento de los diferentes receptores que participan en el reconocimiento del Ag. Este tipo de fagocitosis, denominada **fagocitosis mediada por anticuerpos**, es más rápida que una fagocitosis independiente de anticuerpos, combina la especificidad del anticuerpo y la fagocitosis del macrófago (Figura 5) (Abbas *et al.*, 2014), y puede evaluarse *in vitro* (Mantovani *et al.*, 1972).



**Figura 5. Fagocitosis mediada por anticuerpos** (Abbas *et al.*, 2014).

#### ***II.1.2.2. Respuesta inmune secundaria (RIS)***

La respuesta inmune secundaria es aquella que ocurre en una siguiente exposición al Ag, luego de la RIP. Se caracteriza por ser más rápida, amplia y cualitativamente diferente a la RIP. Esto se debe a la memoria inmunológica generada en la RIP, representada por los linfocitos de memoria. Estas células son más numerosas que los linfocitos vírgenes específicos presentes antes de la RIP y son más eficientes en la respuesta y eliminación del Ag. Por ejemplo, los LB de memoria sintetizan BCRs con mayor afinidad que los producidos en la RIP y por ello son activados más fácilmente.

Otra característica relacionada a la producción de anticuerpos es que durante una RIS el isotipo de anticuerpo específico al Ag predominante en suero es la IgG sobre la IgM.

Además de los cambios en la respuesta de LB, los LT de memoria reaccionan de forma más rápida y enérgica que los LT vírgenes con la exposición al Ag. Esto se debe a que poseen menos requerimientos para ser activados y un fenotipo muy parecido a los LT efectores (Abbas *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2012; Owen *et al.*, 2013).

#### ***II.2 Lessonia trabeculata***

*Lessonia trabeculata* (Villouta y Santelices, 1986) es un alga parda perteneciente a la familia Lessoniaceae (Guiry y Guiry, 2019) (Tabla 2) y crece en la región submareal desde Ancash, Perú hasta Chile (Zavala *et al.*, 2015). Es utilizada principalmente para la obtención de alginatos (Caja *et al.*, 2004) y como producto para la industria alimentaria junto a otras especies de algas pardas (Quitral *et al.*, 2012; Gatlin, 2007). La explotación de *L. trabeculata* en nuestro país tiene como objetivo principal la obtención de alginatos con fines industriales (Caja *et al.*, 2004).



**Tabla 2. Clasificación taxonómica de *L. trabeculata* (Guiry y Guiry, 2019. AlgaeBase).**

Categoría	Nombre
Phylum	Ochrophyta
Clase	Phaeophyceae
Subclase	Fucophycidae
Orden	Laminariales
Familia	Lessoniaceae
Genero	Lessonia
Especie	<i>L. trabeculata</i>

### II.3 Inmunomoduladores

Un inmunomodulador es un producto, natural o artificial, que estimula o reprime la respuesta inmune. Puede ser utilizado para fortalecer o compensar algún desbalance del sistema inmunológico. Entre los ejemplos más conocidos se encuentran la ciclosporina, que es obtenida del hongo *Tolypocladium inflatum*; el tacrolimus, de la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*, entre otros (Craig *et al.*, 2004). Entre los inmunomodulares de origen vegetal se conocen a la curcumina, un compuesto encontrado en el rizoma de *Curcuma longa* (conocido como palillo), el resveratrol de *Fallopia japonica*, andrografolido de *Andrographis paniculata*, ginseng de *Panax ginseng* (Jantan *et al.*, 2015), y otros inmunomoduladores que provienen de *Tinospora cordifolia*, *Acorus calamus*, *Boerhaavia diffusa*, *Hovenia dulcis*, *Coptidis rizoma*, entre otros (Abood, 2017). Sin embargo, el uso de inmunomoduladores sintéticos puede tener efectos secundarios (Bascones *et al.*, 2014), por lo que se buscan incesantemente otras alternativas, preferiblemente naturales, que minimicen estos efectos no deseados.

### II.3.1 El fucoidan como inmunomodulador

El fucoidan es un polisacárido sulfatado con una cadena principal constituida en su mayoría por fucosa que se obtiene de las algas pardas, no obstante, su estructura puede presentar otros azúcares. La composición de azúcares y cantidad de sulfatos puede variar entre las especies e incluso durante diferentes estaciones (Skriptsova *et al.*, 2015; Fletcher *et al.*, 2017).

Hasta la fecha distintos grupos de investigación han evaluado las propiedades del fucoidan de distintas algas pardas, para lo cual han desarrollado diferentes estrategias en el tratamiento y evaluación, ya sea *in vitro* e *in vivo*.

Park *et al.*, (2017) confirmaron el efecto anti-inflamatorio del fucoidan de *Fucus vesiculosus*, observando inhibición de la expresión de mediadores inflamatorios y pro-inflamatorios en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, e *in vivo* descubrieron disminución de la inflamación gingival inducida por *Porphyromonas gingivalis*. En otro género dentro de las algas pardas, Sanjeewa *et al.*, (2017) indicaron que el fucoidan de *Sargassum horneri* tuvo actividad anti-inflamatoria en macrófagos RAW 264.7, reduciendo la producción de NO, expresión de iNOS y citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la IL-1 $\beta$ .

Wu *et al.*, (2016) también demostraron que el fucoidan de *Sargassum cristaefolium* poseía la capacidad de disminuir la producción de NO por macrófagos RAW264.7 activados con LPS de *Escherichia coli*, un potente inductor de inflamación. Lee *et al.*, (2012) evaluaron la actividad anti-inflamatoria *in vitro* del fucoidan de *Ecklonia cava* en macrófagos RAW 264.7 encontrando que 1 de 3 fracciones produjo mejores resultados, disminuyendo la expresión de iNOS, ciclooxygenasa 2 (COX-2), TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , todas estas moléculas mediadoras de inflamación. Omar *et al.*, (2013) trataron ratas con ciclosporina A y fucoidan de *Fucus vesiculosus*, y demostraron que el fucoidan tenía actividad antioxidante en el tejido esplénico. El grupo tratado con fucoidan tuvo disminución de la producción de óxido nítrico

inducido por ciclosporina A y concluyeron que el fucoidan aminoraba los efectos adversos causados por la ciclosporina A.

Contrariamente a su efecto anti-inflamatorio, Choi *et al.*, (2005) observaron que el tratamiento *in vitro* de linfocitos de bazo de ratón con fucoidan de *F. vesiculosus* incrementó su respuesta citotóxica y mostró actividad mitogénica en esplenocitos y macrófagos. Además, los macrófagos peritoneales murinos tratados exhibieron actividad tumoricida inducida, incremento de fagocitosis, producción de nitritos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-6. Jeong *et al.*, (2015) observaron *in vitro* que el fucoidan de *Hizikia fusiforme* (*Sargassum fusiforme*) estimuló la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 y la secreción de TNF- $\alpha$  en esplenocitos murinos.

Halling *et al.*, (2015) aislaron y caracterizaron el fucoidan extraído de *Laminaria hyperborea* descubriendo que tenía la capacidad de incrementar el título de anticuerpos en ratones inmunizados con ovoalbúmina tratados por vía oral con fucoidan. Además, observaron incremento en la expresión de la IL-2 y la fagocitosis en esplenocitos y neutrófilos de ratón, respectivamente. Concluyeron que la dosis con mejor efecto fue 5 mg/kg de p.c. en comparación al grupo tratado con 12 mg/kg. De manera similar, Jin *et al.*, (2014) evaluaron el fucoidan de *F. vesiculosus* como adyuvante, observando su capacidad de incrementar la producción de anticuerpos en ratones inmunizados con ovoalbúmina+fucoidan e inducir la respuesta de Th1. Song *et al.*, (2015) compararon la actividad inmunomoduladora de los polisacáridos sulfatados de 3 algas: *Grateloupia filicina* (Rhodophyta), *Ulva pertusa* (Chlorophyta) y *Sargassum qingdaoense* (Ochrophyta, dentro del cual se encuentran las algas pardas), observando en este último un mejor efecto *in vitro* e *in vivo*. Estos polisacáridos fueron evaluados *in vivo* como adyuvantes en la inmunización con virus de influenza aviar, observándose aumento en la proliferación de linfocitos, el título de

anticuerpos dosis-dependiente y producción de IFN- $\gamma$  e IL-4, este último de forma dosis dependiente.

En otro modelo animal: *Clarias gariepinus* (Pez gato), El-Boshy *et al.*, (2014) utilizaron el fucoidan de *Laminaria japonica* como suplemento alimenticio en individuos normales e inmunosuprimidos con Cadmio, y observaron que el fucoidan tuvo un efecto inmunomodulador positivo en individuos normales e inmunosuprimidos a comparación de los controles; estimulando el estallido respiratorio y fagocitosis de macrófagos. Dado que no se conocía el proceso de absorción del fucoidan, Nagamine *et al.*, (2014) demostraron la absorción intestinal *in vitro* e *in vivo* del fucoidan de *Cladosiphon okamuranus* en ratas alimentadas con fucoidan, detectándose fucoidan en suero, hígado y tejidos del intestino delgado, confirmándose que las moléculas de fucoidan de alto peso molecular podían llegar a atravesar la barrera epitelial y podían ser absorbidas por las células de Kupffer.

La interacción del fucoidan de *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides*, y *F. evanescens* y receptores de inmunidad innata fueron demostrados *in vitro* por Makarenkova *et al.*, (2012), observando que interactuaron con receptores tipo toll: homodímeros 2 y 4 y el heterodímero 2/6; acompañada de la posterior activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Este trabajo sentó las bases de cómo el fucoidan podría tener efecto inmunomodulador sobre células que presentan estos receptores como los macrófagos.

Las citoquinas también pueden ser moduladas por el uso de fucoidan. Kawashima *et al.*, (2011) analizaron el efecto del fucoidan de *Undaria pinnatifida* en células y ratones tratados con la bacteria ácido-láctica *Tetragenococcus halophilus* KK221 y observaron que el fucoidan amplificó la producción de IFN- $\gamma$  dependiente de IL-12 en células de bazo y placas de Peyer *ex vivo*. Los resultados *in vivo* indicaron mejoramiento del inmunobalance Th1/Th2 en ratones inmunizados por vía intraperitoneal con ovoalbúmina. Ahn *et al.*, (2008) evaluaron el efecto inmunomodulador de un extracto de *Ecklonia cava* y observaron que en

los ratones tratados aumentó la proliferación de esplenocitos, número de linfocitos, monocitos y granulocitos. Además, se observó que la expresión a nivel transcripcional y traduccional disminuyó para el TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y aumentó para la IL-4 e IL-10.

También se han reportado resultados acerca del efecto del fucoïdan sobre otros tipos de células. Por ejemplo, Ale *et al.*, (2011) demostraron *in vivo* que la inyección del fucoïdan de *Sargassum sp* y *F. vesiculosus* activa células NK. Kim y Joo, (2008) indicaron que el fucoïdan de *F. vesiculosus* incrementaba la viabilidad de DCs, producción de citoquinas y expresión de receptores, indicando que posee efectos en la maduración de DCs.

Pocos trabajos se conocen del fucoïdan de *L. trabeculata* en el país, uno de ellos es el de Colona *et al.*, (2015) quienes evaluaron el efecto de un extracto de *L. trabeculata* con 25% de fucoïdan sobre cultivos de células mononucleares de sangre periférica y observaron el aumento de nitritos en un esquema dosis-dependiente. Además en las concentraciones 1-100  $\mu\text{g/mL}$  hubo aumento de producción de ERO en comparación al control, los autores concluyeron que los componentes de este extracto poseían efecto inmunomodulador sobre esta población celular. Sin embargo, por su baja concentración, no podría atribuirse el efecto solamente al fucoïdan como principio activo inmunomodulador.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **1. Hipótesis**

El fucoideano de *Lessonia trabeculata* administrado por vía oral en ratones inmunizados con glóbulos rojos de carnero posee actividad moduladora sobre parámetros de la respuesta inmune innata y adaptativa humoral.

#### **2. Objetivos**

##### **a. Objetivo General**

Evaluar la actividad moduladora del tratamiento vía oral con fucoideano de *Lessonia trabeculata* sobre parámetros de la inmunidad innata y humoral adaptativa en ratones inmunizados con glóbulos rojos de carnero.

##### **b. Objetivos Específicos**

1. Evaluar el efecto del fucoideano sobre la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por macrófagos peritoneales de ratones BALB/c inmunizados en la respuesta inmune primaria y secundaria.
2. Evaluar el efecto del fucoideano sobre la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c inmunizados en la respuesta inmune secundaria.
3. Demostrar el efecto del fucoideano sobre el título de anticuerpos hemaglutinantes anti-glóbulos rojos de carnero y su relación con la IL-10 en suero de ratones BALB/c inmunizados en la respuesta inmune primaria y secundaria.
4. Determinar el efecto del fucoideano sobre la expresión génica transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados en la respuesta inmune primaria y secundaria, y su relación con el título de IgM hemaglutinantes.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1 Material Biológico

Se empleó fucoidan liofilizado con una pureza de 81% obtenido de *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices (Figura 6), identificada taxonómicamente en el Herbario de la Universidad Nacional La Molina (UNALM) (Anexo 1). Los ejemplares fueron obtenidos en la Bahía de San Nicolás de Marcona, provincia de Nazca, Ica, Perú (15°11'41"S 75°16'27"O) y procesados por la empresa PSW S.A. La determinación de fucoidan se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UNALM. Como control se usó fucoidan de *Fucus vesiculosus* (95% de pureza), el fucoidan de ambas especies se disolvió en solución salina (NaCl 0.9% p/v) a las concentraciones a emplearse en el estudio.



**Figura 6. Fucoidan de *L. trabeculata* antes de su resuspensión con solución salina al 0.9%.**

### IV.2. Protocolo de tratamiento e inmunización

El tratamiento estuvo basado en el trabajo de Halling *et al.*, (2015) con modificaciones (Laboratorio de Inmunología-FCB-UNMSM). Se utilizó ratones BALB/c machos juveniles adquiridos en el Instituto Nacional de Salud de aproximadamente 6 semanas de edad. Cada ratón fue colocado en una jaula, la temperatura del ambiente (bioterio) fue aproximadamente

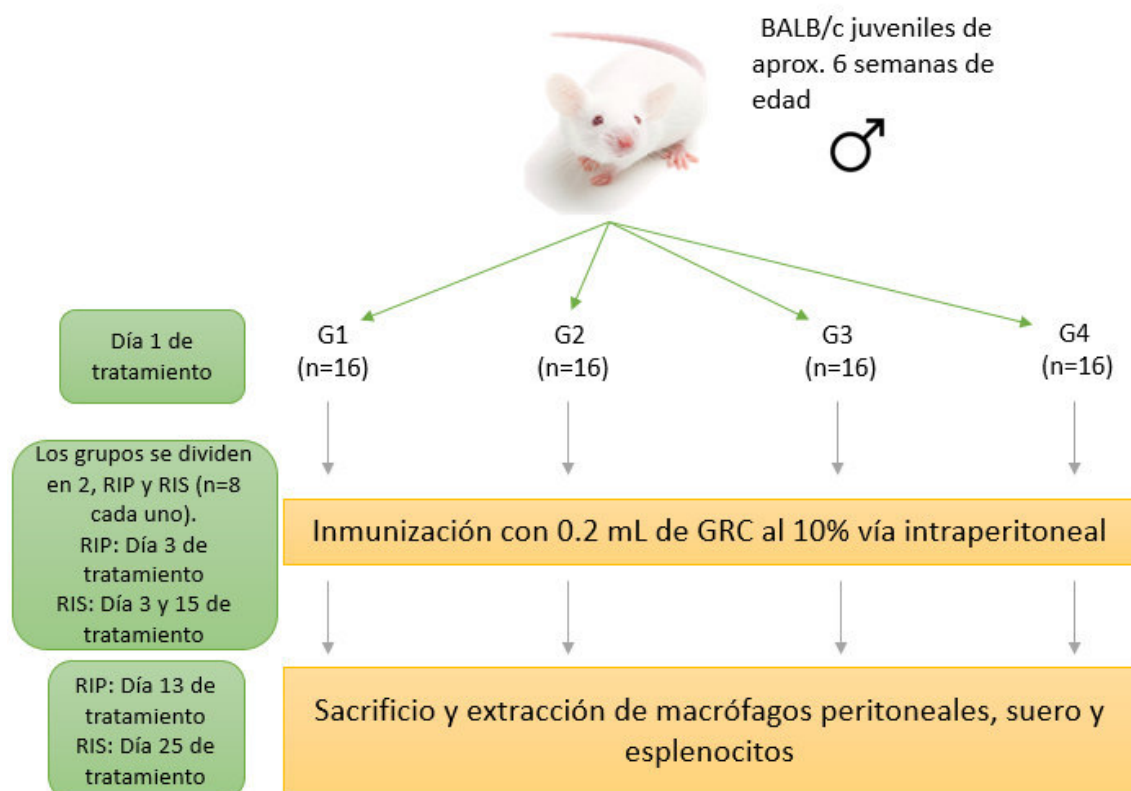
de 24 °C (Figura 7A), los animales se alimentaron con comida balanceada ( $7 \pm 0.2$  g diarios) y agua *ad libitum*, y se distribuyeron en 4 grupos con n=16 cada uno inicialmente: G1 y G2, tratados con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis 5 y 10 mg/kg p.c., respectivamente, y G3 y G4, tratados con fucoidan de *Fucus vesiculosus* (Sigma) con dosis 5 mg/kg p.c. y solución salina (0.9%), respectivamente. Cada liofilizado fue resuspendido en solución salina, observándose un color parduzco (Figura 7B). De manera cíclica, los tratamientos se realizaron durante seis días seguidos de un día sin tratamiento. Para administrar las dosis a los ratones se utilizó una jeringa tuberculina sin aguja (Figura 7C).

Posteriormente, los ratones fueron inmunizados con 0.2 mL de GRC al 10% por vía i.p. el tercer día de tratamiento (Figuras 7D y 8). Luego cada grupo fue dividido en 2 (n=8 cada uno), para evaluarse la RIP y RIS. Los ratones para RIP fueron tratados por 13 días y el resto, por 25 días con una segunda inmunización i.p. en el día 15 de tratamiento (Figura 8).



**Figura 7. Tratamiento y condiciones de cuidado de ratón.** A) Los ratones fueron colocados 1 por jaula. B) Tratamientos dados, de izquierda a derecha: G1, G2 (fucoidan de *L. trabeculata*), G3 (fucoidain de *F.vesiculosus*) y G4 (solución salina). C) Ratón tomando dosis vía oral. D) Ratón inmunizado con GRC i.p.





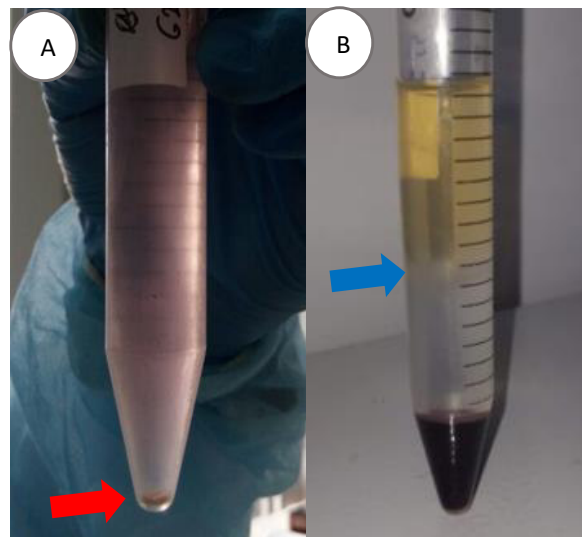
**Figura 8. Flujograma de tratamiento de los grupos.** G1 y G2: fucoïdan de *L. trabeculata* con dosis 5 y 10 mg/kg p.c., respectivamente, G3: fucoïdan de *F. vesiculosus* 5 mg/kg p.c., G4: solución salina (0.9%), GRC: glóbulos rojos de carnero, RIP y RIS: respuesta inmune primaria y secundaria, respectivamente.

#### IV.3 Disección, obtención de macrófagos, esplenocitos y suero

Los ratones, post-mortem, fueron sumergidos en alcohol yodado, se retiró la piel del abdomen dejando intacto el peritoneo. Luego con una jeringa se inocularon 5 mL de medio RPMI-1640 base (Anexo 2) frío y se realizó un masaje suave del peritoneo para distribuir el medio y que haga contacto con los órganos. Después con la misma jeringa se recuperó el líquido y se colocó en un tubo de 15 mL. Este procedimiento se hizo para 3 ratones por tratamiento tomados de manera aleatoria y las muestras se juntaron en un mismo tubo de 15 mL. La mezcla fue centrifugada a 800 rpm por 8 min (Figura 9A). El sobrenadante fue descartado y se agregó 1 mL de medio RPMI-1640 completo (medio RPMI-1640 base con

suero bovino fetal al 10%). De esta muestra se hizo la cuantificación de la población celular viable mediante tinción con azul de tripan, empleando una cámara de Neubauer.

Para la obtención de esplenocitos, los bazo de 3 ratones fueron retirados y colocados en placas de Petri estériles con medio 3 mL de RPMI-1640 entre trozos estériles de papel filtro y tela de organza. Los bazo fueron disgregados mecánicamente y se recuperó aproximadamente 1.5 mL del líquido que fue colocado en tubos de 15 mL con 0.75 mL Fycoll-Hypaque. Se centrifugó a 1520 rpm por 25 min. Los anillos obtenidos de los 3 bazo (Figura 9B) fueron recuperados, colocados en un tubo de 15 mL y lavados con 1 mL de medio RPMI 1640 a 1000 rpm por 5 min. El sobrenadante se descartó y se resuspendió las células en 1 mL RPMI-1640 completo. De esta muestra se hizo la cuantificación de la población celular viable mediante tinción con azul de tripan, empleando una cámara de Neubauer.



**Figura 9. Obtención de células inmunes.** A) macrófagos peritoneales extraídos luego de ser centrifugados en medio RPMI-1640 (flecha roja), B) anillo células mononucleares del bazo (flecha azul).

Para la obtención de suero, los ratones fueron sangrados post-mortem, mediante punción cardiaca directa evitando hemólisis. La sangre fue colocada en microtainers con gel separador y colocado en frío al menos por 30 min a 4 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 10 min (Figura 10). Los sueros fueron traspasados a microtubos y congelados a -80 °C hasta su uso. Los sueros antes de su análisis fueron descongelados y descomplementados en baño María a 56 °C por 30 min para la titulación por hemaglutinación. Para la detección de IL-10 por ELISA se utilizaron sueros sin descomplementar.

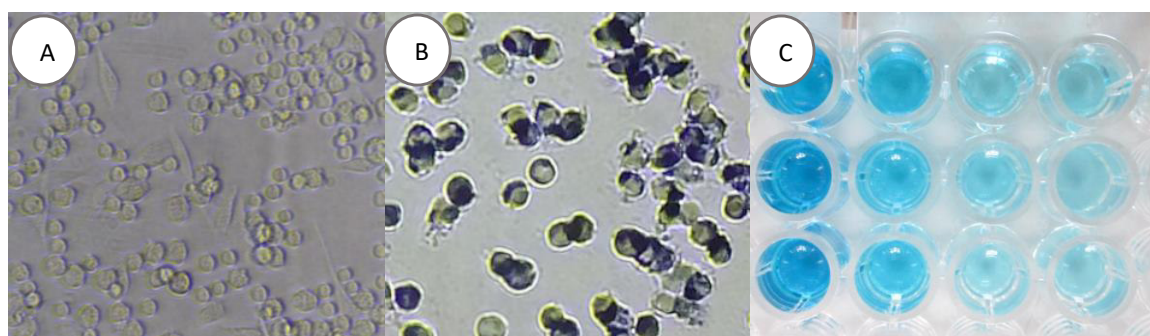


**Figura 10. Suero de ratones separado en microtainer con gel separador.** Se observa el suero en la fase superior del contenido del tubo sobre el gel separador.

#### **IV.4 Producción de especies reactivas de oxígeno o estallido respiratorio por macrófagos peritoneales**

La producción de ERO intracelular fue medido mediante la prueba de reducción del NBT que es una medida de la producción de anión superóxido intracelular. La metodología se realizó de acuerdo a Grando *et al.*, (2009) con algunas modificaciones (Laboratorio de Inmunología-FCB-UNMSM). Se colocó 100  $\mu$ L de medio completo con  $10^5$  células en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos (3 repeticiones por grupo) y se incubó por 2 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> para propiciar la adherencia (Figura 11A). Posteriormente, el medio fue reemplazado por 100  $\mu$ L de medio RPMI-1640 completo con NBT (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) utilizando

un stock de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Anexo 3) y se incubó por 1 h bajo las mismas condiciones. Como control positivo de estimulación se utilizó PMA (100 ng/mL). Después el sobrenadante fue eliminado y el pocillo se lavó con 200  $\mu\text{L}$  PBS 1X, seguido de un lavado con 200  $\mu\text{L}$  de metanol puro y se dejó secar al ambiente (Figura 11B). Una vez seco, se agregó 120  $\mu\text{L}$  de KOH 2M y 140  $\mu\text{L}$  de DMSO por 10 min (Figura 11C). Pasado este tiempo, se leyó la D.O. de los pocillos en una lectora de placas de ELISA a 630 nm.



**Figura 11. Producción de especies reactivas de oxígeno o estallido respiratorio por macrófagos peritoneales.** A) Macrófagos peritoneales cultivados durante 2h. B) Macrófagos con formazán precipitado intracelularmente luego de la reducción del NBT con  $\text{O}_2^-$ . C) Formazán resuspendido listo para medición.

#### IV.5 Producción de especies reactivas de nitrógeno

Para cuantificar la producción de ERN extracelular se utilizó la reacción de Peter Griess, el cual detecta  $\text{NO}_2$ . La metodología se realizó de acuerdo a Grando *et al.*, (2009) con algunas modificaciones (Laboratorio de Inmunología-FCB-UNMSM). Se cultivaron 100  $\mu\text{L}$  con  $10^5$  células en placas de 96 pocillos por 48 h a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Como control positivo de estimulación se utilizó LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posterior a la incubación, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se colocó en otros pocillos en donde se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo 1 del sistema de reactivos de Griess de Promega (sulfanilamida) por 10 min y luego, 50  $\mu\text{L}$  del reactivo 2 (N-(1-Naftil) etilendiamina, NED) por 30 min a temperatura ambiente, tornándose

grosella en presencia de  $\text{NO}_2$  (Figura 12). Pasado este tiempo se midió la D.O. en una lectora de placas de ELISA a 492 nm. Los valores obtenidos fueron llevados a concentración de nitritos mediante una curva de calibración (Anexo 4).



**Figura 12. Producción de especies reactivas de nitrógeno.** Se utilizó la reacción de Peter Griess para detectar nitritos, una especie reactiva de nitrógeno. La intensidad del color grosella es directamente proporcional a la concentración de  $\text{NO}_2$ .

#### **IV.6 Fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales**

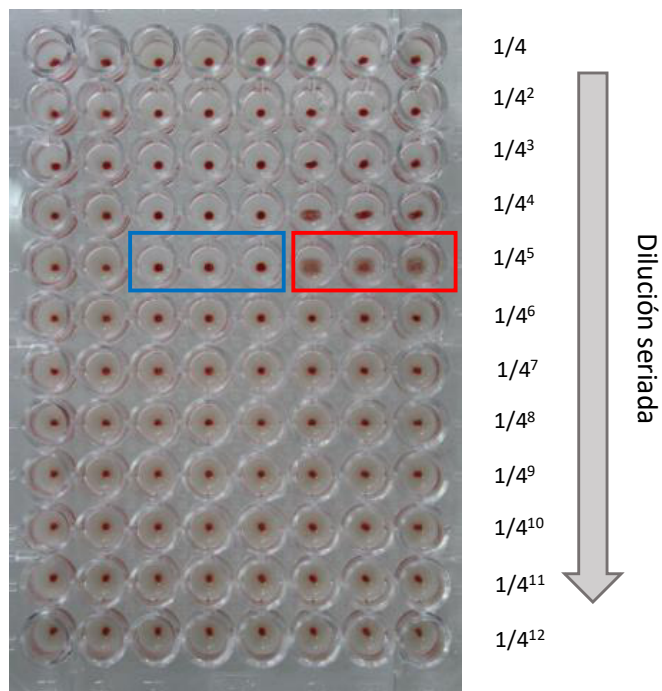
Este método permite identificar de manera indirecta la producción de IgG debido a que los macrófagos estimulados expresan  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ . Una suspensión de 100  $\mu\text{L}$  de macrófagos ( $5 \times 10^6$  células) fue colocada en un microtubo, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de GRC al 0.2% (V/V) y se incubaron por 1 h a 37 °C. Posterior a la incubación, se realizó la observación para verificar la presencia de rosetas Fc. Una vez confirmada la formación de rosetas se tomó una muestra de 20  $\mu\text{L}$  y se colocó sobre una lámina desengrasada haciendo un frotis y después de secar se agregó colorante de Wright de manera que cubra la muestra por 3 min. Se agregó agua destilada por 10 min y se lavó con la misma, para eliminar restos de colorante y observar un mejor contraste. La actividad fagocítica y el índice fagocítico se realizaron por triplicado en cada grupo y se determinaron de la siguiente manera:

$$\text{Actividad fagocítica} = \frac{\text{número de macrófagos con al menos 1 partícula fagocitada}}{200 \text{ macrófagos}}$$

$$\text{Índice fagocítico} = \frac{\text{número de partículas fagocitadas}}{200 \text{ macrófagos}}$$

#### IV.7 Titulación de anticuerpos anti-GRC por hemaglutinación

Los títulos de anticuerpos hemaglutinantes anti- GRC fueron cuantificados mediante mezcla de 75  $\mu\text{L}$  de diluciones seriadas del suero con PBS 1X con factor de dilución 4 y 25  $\mu\text{L}$  GRC al 1% en una placa de 96 pocillos con base redonda. Esta mezcla fue incubada por 30 min a 37 °C y luego las placas fueron colocadas a 4 °C dentro de una cámara húmeda *overnight* para la confirmación del título (Figura 13).



**Figura 13. Titulación de anticuerpos anti-GRC por hemaglutinación.** Se realizaron diluciones seriadas del suero en placas de 96 pocillos con base redonda y se enfrentaron con GRC durante 24 h a 4 °C. El recuadro rojo indica resultados positivos (aglutinación) y el azul, negativos (botón).

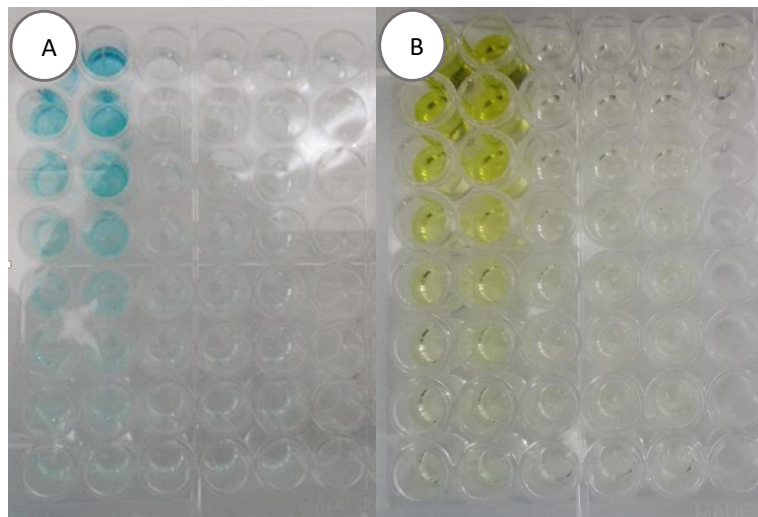
#### **IV.8 Detección de IL-10 en suero por inmunoensayo enzimático (ELISA)**

Se determinó la presencia de IL-10 en los sueros obtenidos mediante el kit *mouse IL-10 Uncoated ELISA* de Invitrogen siguiendo el protocolo del fabricante que se describe a continuación.

En la placa de ELISA de 96 pocillos se agregaron 100 µL de anticuerpo de captura por pocillo, la placa fue sellada e incubada a 4 °C *overnight*. Posteriormente, los pocillos fueron lavados 3 veces con 260 µL de buffer de lavado reposando durante 1 min por lavado. Luego de secar los pocillos, se bloquearon los pocillos con 200 µL de diluyente ELISA/ELISPOT por 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se extrajo el diluyente y se hizo un lavado con buffer de lavado como se describió anteriormente y se volvió a secar. Se agregaron 100 µL de las muestras, las cuales consistieron en la mezcla de 3 sueros de ratones del mismo tratamiento, diluidos 1:4 y se analizaron por triplicado. Se selló la placa y se incubó *overnight* a 4 °C para permitir máxima detección. Los pocillos fueron lavados 4 veces con buffer de lavado como se ha descrito previamente. Secados los pocillos, se agregaron 100 µL de anticuerpo de detección por pocillo, se selló la placa y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Después, se secaron los pocillos y se lavó 4 veces con buffer de lavado como se ha descrito anteriormente. Se agregaron 100 µL de avidina-HRP a cada pocillo, se selló y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Se extrajo el líquido de los pocillos y se realizó 6 lavados como se ha descrito anteriormente, se quitó el líquido y se agregaron 100 µL a cada pocillo de solución TMB seguido de una incubación a temperatura ambiente por 15 min (Figura 14A). Finalmente se agregaron 50 µL de solución *stop* a cada pocillo (Figura 14B) y se leyó a 450 nm con referencia 630 nm en lector de ELISA. Como



controles positivos se utilizó IL-10 recombinante, que se utilizaron a su vez para generar la curva estándar o de calibración para la obtención de concentración (Anexo 6).



**Figura 14. Detección de IL-10 en suero por ELISA.** El viraje de color es directamente proporcional a la concentración de IL-10 y se hace evidente A) antes y B) después de agregar la solución *stop*. Las 2 primeras columnas de pocillos a la izquierda de cada imagen son resultados de la dilución seriada del control estándar para la determinación de la curva de calibración.

## IV.9 Expresión génica transcripcional para citoquinas de respuesta humoral producidas por esplenocitos

### IV.9.1 Obtención de mRNA y síntesis de cDNA

Se obtuvo RNA de  $5 \times 10^6$  esplenocitos utilizando el *Kit innuPREP RNA Mini* según el protocolo dado por el manufactor y se describe a continuación. El medio fue eliminado mediante centrifugación a 1000 rpm por 5 min y descarte. Se agregaron 400  $\mu$ L de solución de lisis RL al pellet y se dejó a temperatura ambiente por 2 min. Se resuspendió el lisado y fue transferido dentro del filtro spinD, centrifugado a 12000 rpm por 2 min y se eliminó el filtro. Se le agregó al tubo colector con el filtrado 400  $\mu$ L de etanol al 70%. Luego se homogenizó y transfirió al filtro spinR contenido en un nuevo tubo colector, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y se descartó el tubo colector junto al líquido filtrado, reemplazando



el tubo colector con uno nuevo. Se agregaron 500  $\mu$ L de solución de lavado HS en el filtro spinR, se centrifugó el sistema a 12000 rpm por 1 min, se descartó el tubo colector con filtrado y se reemplazó con un tubo colector nuevo. Se añadió 700  $\mu$ L de solución LS en el filtro spinR y se centrifugó el sistema a 12000 rpm por 1 min. Posteriormente, se descartó el tubo colector con filtrado y se colocó el filtro spinR en un nuevo tubo colector. Se centrifugó a 12000 rpm por 3 min para eliminar todo el etanol y se descartó el tubo colector. El filtro spinR se colocó en un tubo de elución de 1.5 mL, se agregó 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm por 2 min. Se repitió desde que se agregó agua libre de nucleasas esta vez con 20  $\mu$ L. La muestra fue alicuotada y guardada a -80 °C hasta su uso. La cuantificación de RNA extraído se realizó mediante fluorometría usando el Qubit 3.0. según el protocolo dado por el fabricante. Para ello, se mezclaron 199  $\mu$ L de buffer con 1  $\mu$ L de colorante, ambos provistos en el kit. Luego se tomaron 199  $\mu$ L de esta mezcla y se le agregó 1  $\mu$ L de la muestra. Se incubó por 2 minutos protegiéndola de la luz y se realizó la lectura.

La generación de cDNA se realizó con el kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis* (ThermoScientific) según las indicaciones del fabricante y se describen a continuación. Se agregaron 4  $\mu$ L de 5X reaction mix, 2  $\mu$ L de maxima enzyme mix, 100 ng de RNA y agua libre de nucleasas c.s.p. 20  $\mu$ L. Las condiciones de retrotranscripción fueron las siguientes: Extensión a 25 °C por 10 min, síntesis de cDNA a 50 °C por 15 min, finalización a 85 °C por 5min y enfriado a 4 °C indefinidamente. El cDNA generado fue cuantificado mediante Qubit 3.0., similarmente a la cuantificación del RNA Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

#### **IV.9.2 Análisis de la expresión de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10**

La amplificación de las citoquinas de interés fue realizada utilizando los *primers*, mostrados en la Tabla 3, y las condiciones de PCR propuestas por Ulett *et al.*, (2000) con algunas

modificaciones. Para ello se utilizó un volumen de reacción de 20 µL conteniendo: *Supermix Platinum 1X* (Invitrogen), *primer forward* y *reverse* 0.5 µM cada uno y 0.5 ng de cDNA. Las condiciones de ciclaje fueron: 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos, para GAPDH, o 35, para IL-4 e IL-10. Los ciclos consistieron en: 94 °C por 30s, 60 °C por 30s y 72 °C por 30s, y posteriormente 72 °C por 7 min de extensión final. Para la IL-5 e IL-6 se utilizaron las siguientes condiciones: 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de: 94 °C por 30s, 55 °C por 30s y 72 °C por 30s, y posteriormente 72 °C por 7 min de extensión final.

**Tabla 3. *Primers* utilizados para el análisis de expresión génica transcripcional para citoquinas de respuesta humoral producidas por esplenocitos.**

Gen	Secuencia 5' → 3'	Tamaño(pb)	Referencia
GAPDH	F: CTACTGGTGTCTTCACCACC	259	Overbergh <i>et al.</i> , (1999)
	R: GTGGCAGTGATGGCATGGAC		
IL-4	F: CGAAGAACACCACAGAGAGTGAGCT	180	Murray <i>et al.</i> , (1990)
	R: GACTCATTTCATGGTGCAGCTTATCG		
IL-5	F: TCACCGAGCTCTGTTGACAA	201	Le Moine <i>et al.</i> , (1999)
	R: CCACACTTCTCTTTTGGCG		
IL-6	F: AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	159	Lai <i>et al.</i> , (2017)
	R: TCCACGATTTCCCAGAGAAC		
IL-10	F: ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA	237	Bohn <i>et al.</i> , (1994)
	R: CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA		

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.7% utilizando buffer TBE 1X (Anexo 7) durante 45 min a 100 Voltios. Se tomaron imágenes de los geles mediante el fotodocumentador Enduro™ GDS (Labnet). Para la comparación en la expresión de citoquinas se utilizó el programa ImageJ y se semi-cuantificó la expresión mediante la división entre el área de los picos generados por las bandas de las citoquinas y divididas con el área del GAPDH, como gen control, para normalizar la expresión (Overbergh *et al.*, 1999; Antiabong *et al.*, 2016).

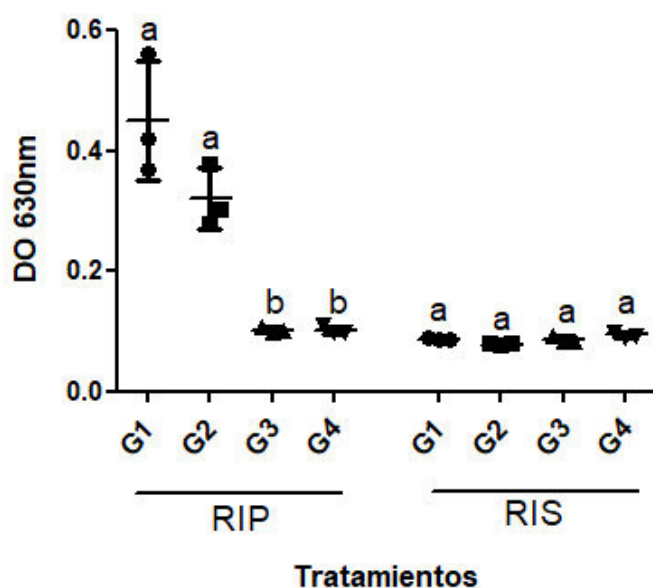
#### **IV.10 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en la producción de ERO, ERN, fagocitosis mediada por anticuerpos, producción de hemaglutininas y concentración de IL-10 sérico fueron analizados mediante el programa Prism5. Y se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba Tukey para determinar si hay diferencias significativas entre los grupos, siendo las diferencias significativas si el  $p < 0.05$ .

## V. RESULTADOS

### V.1. Producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos peritoneales

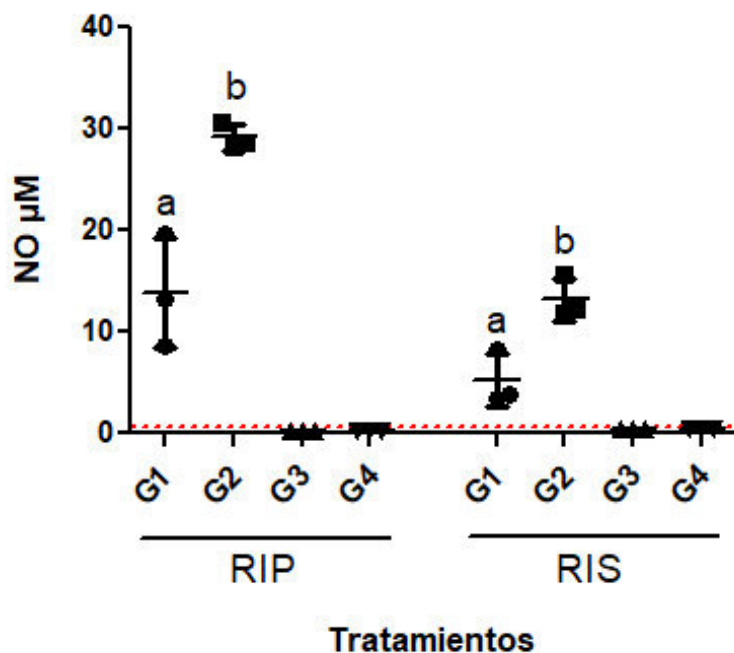
Los resultados de la producción de ERO, específicamente de anión superóxido, se muestran en la Figura 15. Se puede observar en la RIP que la producción de ERO fue mayor en los macrófagos provenientes de los grupos tratados con fucoidan de *L. trabeculata* (G1 y G2), ambos grupos tratados con mayor producción que los grupos G3 y G4 de forma significativa ( $p < 0.05$ ). En la RIS, no se observó diferencia significativa entre los grupos ( $p > 0.05$ ) (Anexo 8).



**Figura 15. Producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos peritoneales.** D.O. medida a 630 nm luego de la prueba de NBT en cultivo macrófagos peritoneales ( $10^5$  células/pocillo) de ratones inmunizados con glóbulos rojos de carnero i.p. G1 y G2 tratados con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis 5 mg/kg p.c. y 10 mg/kg p.c., respectivamente, G3, con fucoidan de *F. vesiculosus* 5 mg/kg p.c. y G4, solución salina (0.9%). RIP y RIS: Respuesta Inmune Primaria y Secundaria, respectivamente. Se indica la media entre los bigotes (desviación estándar). Los grupos que no comparten las mismas letras dentro de RIP o RIS presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## V.2. Producción de especies reactivas de nitrógeno por macrófagos peritoneales

Los resultados de la producción de ERN, en especial de nitritos, se muestran en la Figura 16. En la RIP puede observarse que los grupos tratados con fucoidan de *L. trabeculata* presentaron mayor producción que los grupos G3 y G4 ( $p<0.05$ ). Además, este aumento de la producción fue dosis dependiente de forma significativa,  $G1 < G2$  ( $p<0.05$ ). En la RIS puede observarse un comportamiento similar al descrito en RIP y que la producción de nitritos en los grupos G1 y G2 en RIS llega a un valor aproximado de la mitad de los obtenidos en RIP (Anexo 8).

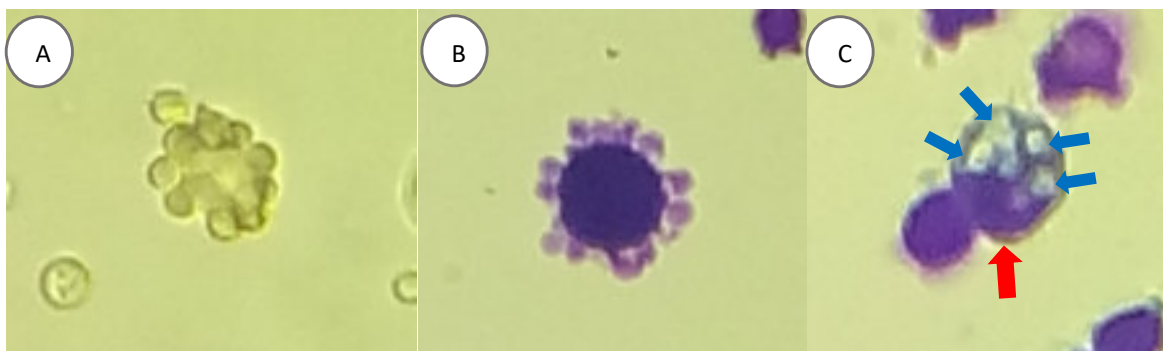


**Figura 16. Producción de especies reactivas de nitrógeno por macrófagos peritoneales.** Concentración de NO en cultivo macrófagos peritoneales ( $10^5$  células/pocillo) de ratones inoculados con glóbulos rojos de carnero i.p. G1 y G2 tratados con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis 5 mg/kg p.c. y 10 mg/kg p.c., respectivamente, G3, con fucoidan de *F. vesiculosus* 5 mg/kg p.c. y G4, solución salina (0.9%). RIP y RIS: Respuesta Inmune Primaria y Secundaria, respectivamente. Los grupos que no comparten las mismas letras presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ). La línea roja punteada indica el mínimo valor detectable por la curva de calibración ( $0.57 \mu\text{M}$ ).

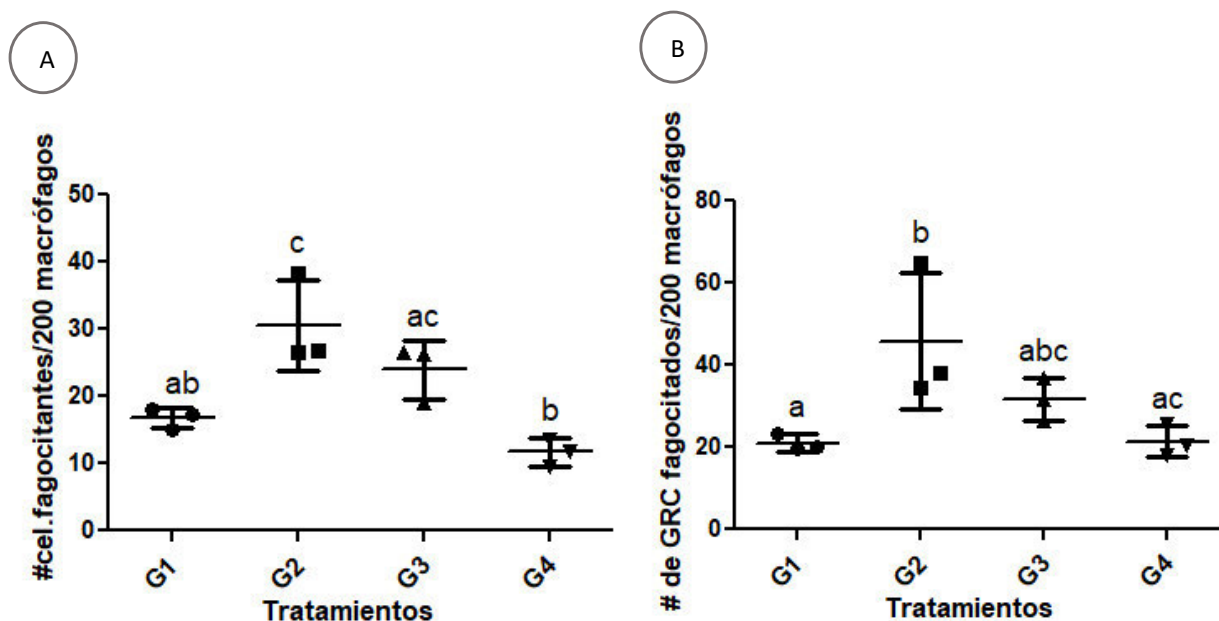
### V.3. Efecto del fucoidan sobre la fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales en la respuesta inmune secundaria

Luego de 1 hora de incubación de macrófagos con GRC, se confirmó la formación de rosetas Fc (Figura 17A), característico de la fagocitosis mediada por anticuerpos, y luego de la tinción Wright aún pudo observarse rosetas y además GRC ingeridos de color claro (Figuras 17B y 17C). Los valores obtenidos en la actividad fagocítica (Figura 18A), indican que G2 presentó la mayor cantidad de células fagocitantes, obteniéndose diferencias significativas con los grupos G1 y G4 ( $p<0.05$ ). El grupo G1 no presentó diferencias significativas con G3 ni G4 (Anexo 8).

Además, el índice fagocítico (Figura 18B) indica que G2 presentó mayor valor ( $p<0.05$ ), lo cual se relaciona con lo observado en la actividad fagocítica. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre G2 y G3 ( $p>0.05$ ). El grupo G1 tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas con G3 y G4 ( $p>0.05$ ). Estos resultados en conjunto indican que el grupo tratado con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis de 10 mg/kg de p.c. estimula la fagocitosis mediada por anticuerpos (Anexo 8).



**Figura 17. Fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales.** A) Formación de rosetas Fc de macrófagos con GRC. B) Rosetas Fc luego de tinción de Wright y C) GRC fagocitados (flechas azules) en el interior de macrófago (flecha roja). Aumento: 1000X.

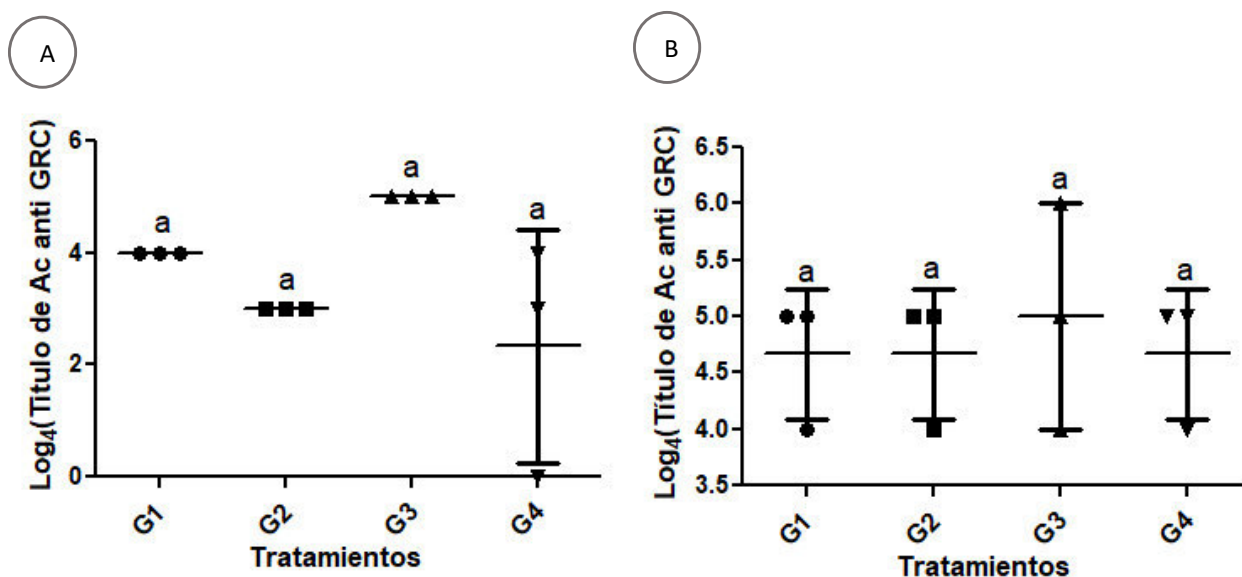


**Figura 18. Fagocitosis mediada por anticuerpos por macrófagos peritoneales en la Respuesta Inmune Secundaria.** A) Actividad fagocítica y B) índice fagocítico por 200 macrófagos peritoneales enfrentados a GRC.  $10^5$  células/pocillo) de ratones inoculados con glóbulos rojos de carnero i.p. G1 y G2 tratados con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis 5 mg/kg p.c. y 10 mg/kg p.c., respectivamente, G3, con fucoidan de *F. vesiculosus* 5 mg/kg p.c. y G4, solución salina (0.9%). Se indica la media entre los bigotes (desviación estándar). Los grupos que no comparten las mismas letras presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### V.4. Efecto del fucoidan sobre el título de anticuerpos anti-GRC

Los títulos de anticuerpos hemaglutinantes séricos de los diferentes grupos en la RIP y RIS se presentan en la Figura 19 y en el anexo 5. En la RIP (Figura 19A), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ). No obstante, si se comparan los grupos G1, G2 y G3, se observa menor producción en los grupos tratados con fucoidan de *L. trabeculata*, siendo menor en G2. De forma similar, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la RIS ( $p > 0.05$ ) (Figura 19B).

Estos resultados indican que el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata* no afecta la producción de anticuerpos hemaglutinantes anti-GRC en la RIP ni RIS.

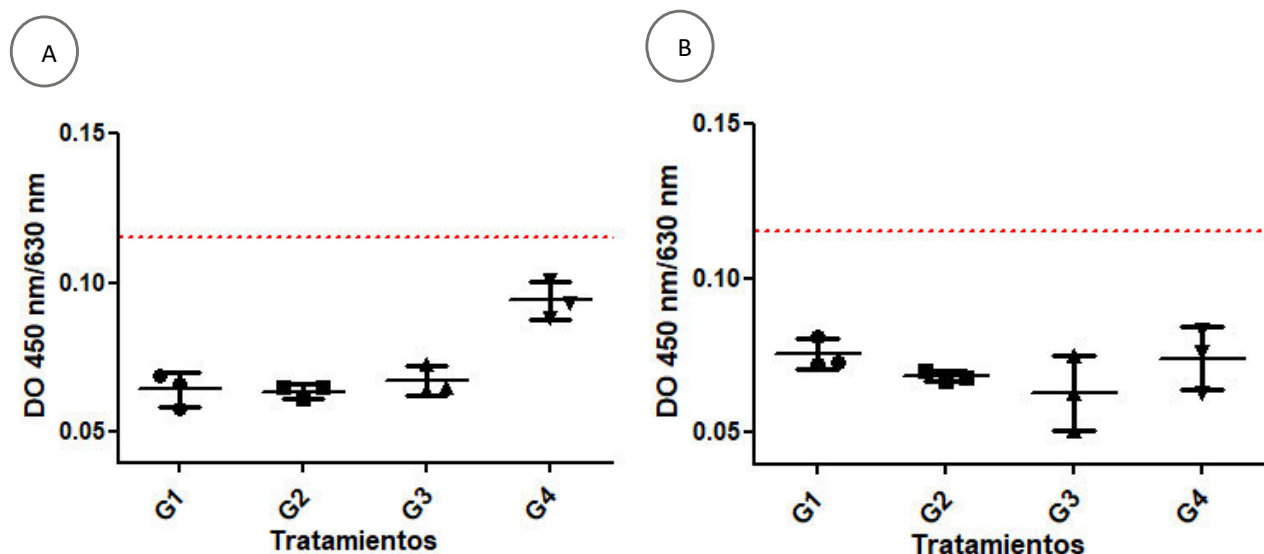


**Figura 19. Título de anticuerpos séricos hemaglutinantes anti-GRC.** A) Respuesta Inmune Primaria y B) Secundaria. G1 y G2 tratados con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis 5 mg/kg p.c. y 10 mg/kg p.c., respectivamente, G3, con fucoidan de *F. vesiculosus* 5 mg/kg p.c. y G4, solución salina (0.9%). Se indica la media entre los bigotes (desviación estándar). Los grupos que no comparten las mismas letras presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### V.5. Efecto del tratamiento con fucoidan en la producción de IL- 10 en suero

Los resultados de IL-10 secretada en suero (Figura 20) indican que los niveles de todos los grupos estuvieron por debajo del mínimo valor detectable por la curva de calibración (32 pg/mL). Lo que indica que el tratamiento con fucoidan no estimuló la producción de IL-10 en suero, siendo el mínimo detectable 128 pg/mL.



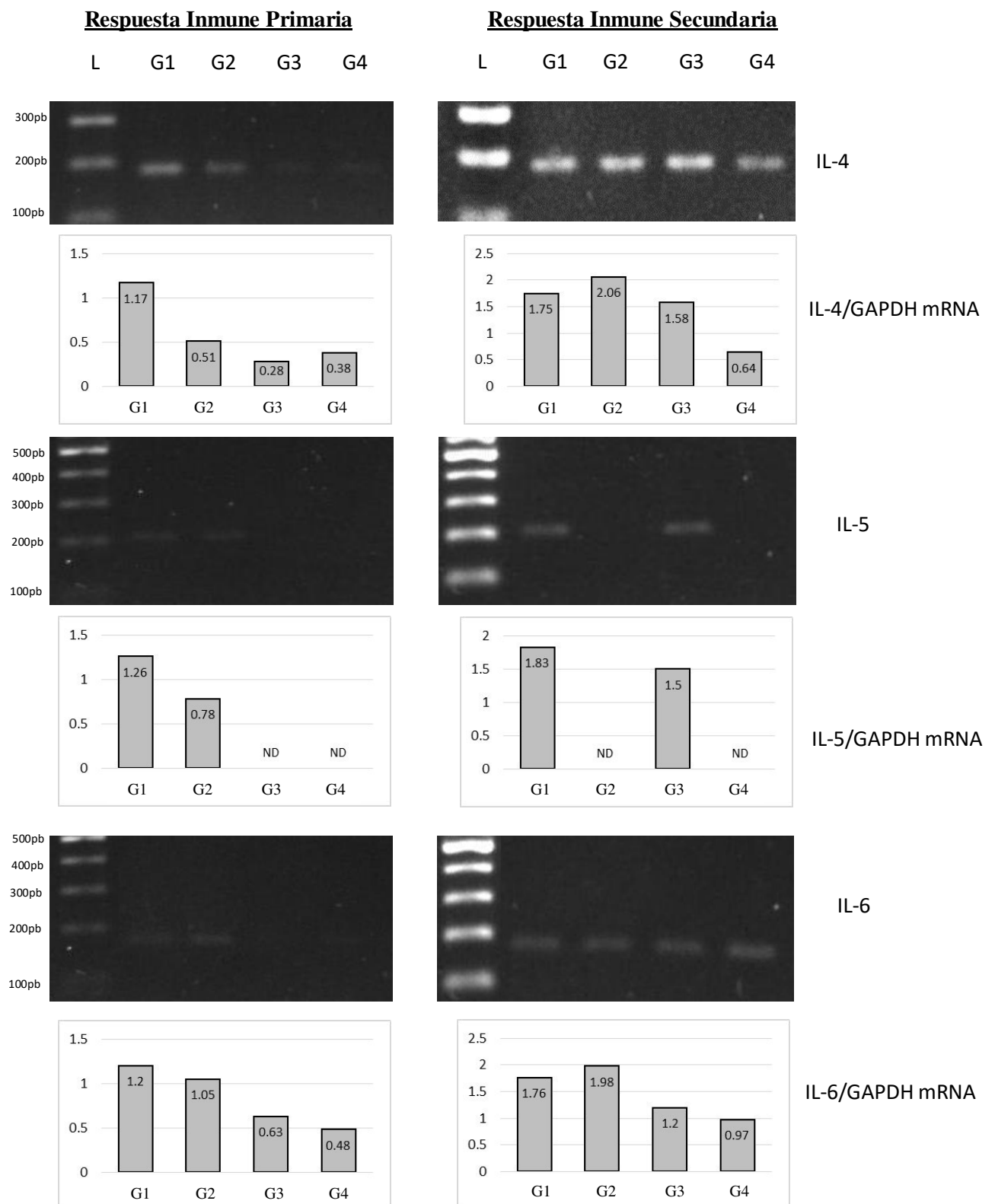


**Figura 20. Producción de IL-10 en suero.** A) Respuesta Inmune Primaria y B) Secundaria. G1 y G2 tratados con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis 5 mg/kg p.c. y 10 mg/kg p.c., respectivamente, G3, con fucoidan de *F. vesiculosus* 5 mg/kg p.c. y G4, solución salina (0.9%). Se indica la media entre los bigotes (desviación estándar). La línea roja punteada indica el mínimo valor detectable por la curva de calibración (32 pg/mL).

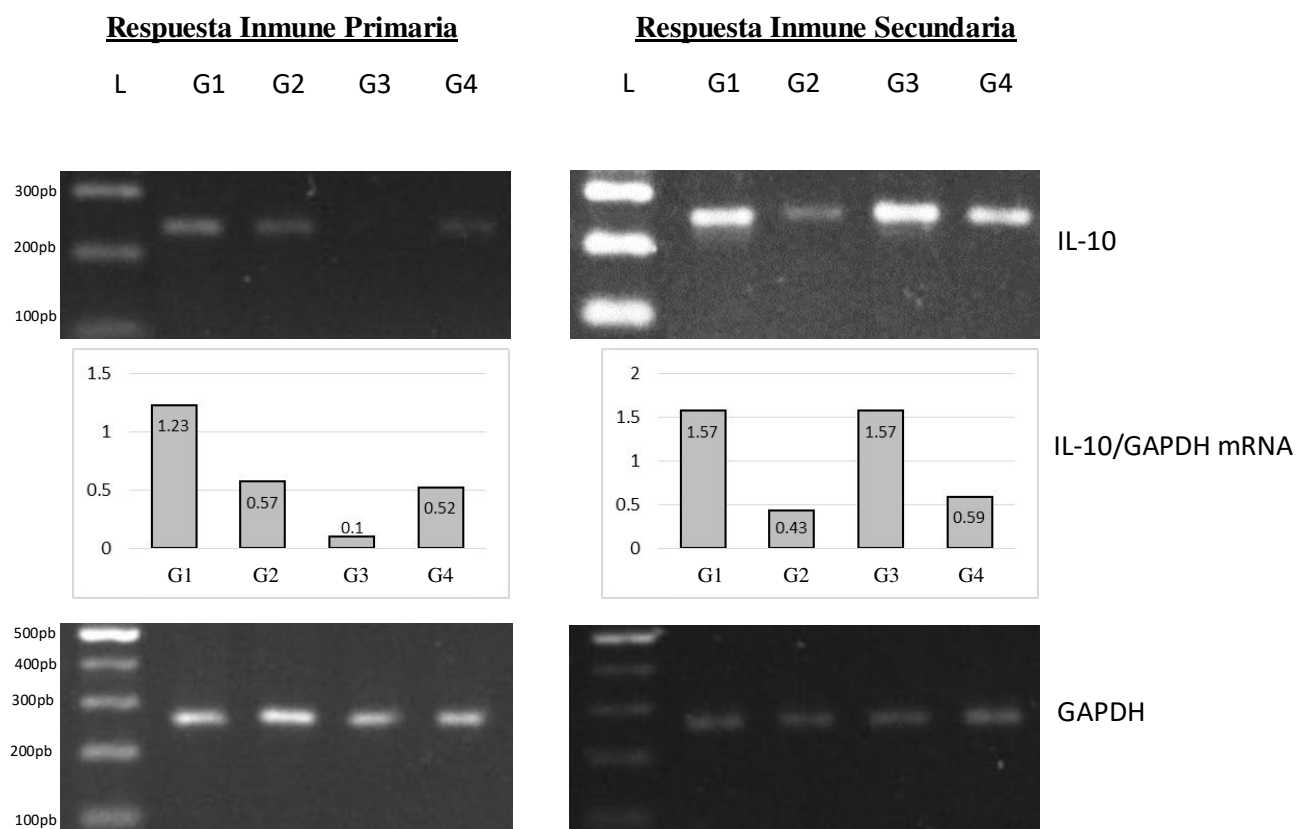
## V.6. Expresión génica transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 en esplenocitos

En la Figura 21 se pueden observar los resultados de la expresión de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. En la RIP, los esplenocitos de ratones tratados con fucoidan de *L. trabeculata*, G1 y G2, presentaron expresión transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Cualitativamente puede observarse mayor expresión en estos grupos en comparación con los grupos G3 y G4 (Anexo 8). Además, la expresión de IL-10 fue similar entre el grupo G2 y G4.

En la RIS, la expresión de IL-4 se dio en todos los grupos, siendo aparentemente mayor en los grupos G1, G2 y G3, comparado con G4. La expresión de IL-5 fue detectada solo en los grupos G1 y G3 (Anexo 8). La producción de IL-6 fue detectada en todos los grupos, siendo aparentemente mayor en los grupos G1 y G2, con aumento proporcional a la dosis. La expresión transcripcional de IL-10 del grupo G1 y G3 fue sugerentemente mayor que el grupo G4 y este último fue mayor que G2.



**Figura 21. Expresión génica transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por esplenocitos en la Respuesta Inmune Primaria y Secundaria (Continúa).**



**Figura 21. Expresión génica transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por esplenocitos en la Respuesta Inmune Primaria y Secundaria.** Se muestran los resultados de la RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Cada carril representa una muestra obtenida de la mezcla de esplenocitos de 3 ratones del mismo tratamiento. Bajo cada imagen de electroforesis se muestran los valores de la semi-cuantificación realizada en ImageJ, explicado en materiales y métodos. L: Ladder, G1 y G2 tratados con fucoidan de *L. trabeculata* con dosis 5 mg/kg p.c. y 10 mg/kg p.c., respectivamente, G3, con fucoidan de *F. vesiculosus* 5 mg/kg p.c. y G4, solución salina (0.9%). GAPDH fue utilizado como control interno de expresión.

## VI. DISCUSIÓN

El extracto de fucoidan de *L. trabeculata* utilizado tuvo una pureza del 81%, lo que no permite descartar la influencia de otros componentes sobre los parámetros analizados. Chavez *et al.*, (2017) indicaron que este extracto contenía polifenoles, taninos, cardenólidos, terpenos y elementos traza (Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu y Na). Estas sustancias, a excepción de los elementos traza, han sido estudiados y algunos trabajos demuestran sus propiedades inmunomoduladoras (Chojnacka *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2018; Ciaglia *et al.*, 2017; Maggini *et al.*, 2007; Lukác y Massányi, 2007). Además de lo reportado por Chavez *et al.*, (2017), la tonalidad parduzca que conservó el fucoidan puede deberse a la presencia de la fucoxantina, que es el pigmento que le da el color a estas algas (Peng *et al.*, 2011). Este compuesto también pudo influir ya que se ha demostrado su capacidad inmunomoduladora (Kawashima, 2011; Peng *et al.*, 2011). A pesar de lo mencionado, la concentración del fucoidan utilizado y su gran cantidad de reportes como inmunomodulador permite que se le atribuya predominantemente la capacidad inmunomoduladora observada en esta investigación.

Con el objetivo de evaluar las propiedades inmunomoduladoras del fucoidan de las algas pardas, diferentes autores han abordado distintas estrategias para demostrarlas (Halling *et al.*, 2015; Ahn *et al.*, 2008; Ale *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2014 y Kim y Joo 2008). En esta investigación se utilizó el modelo de ratones inmunizados con GRC para la evaluación del efecto del fucoidan sobre distintos parámetros de la respuesta inmune generada. Los GRC fueron utilizados porque son capaces de generar una respuesta humoral y celular (Levine, 1987; Reikvam, 1976; Stamm *et al.*, 2013; Ladics, 2007); y estas respuestas son susceptibles a ser moduladas por compuestos químicos, biomoléculas, microorganismos, entre otros (Shima *et al.*, 1987; Brodeur y Merigan, 1974; Hayashi *et al.*, 2007; Gray y Phillips, 1983).

Los resultados indican que la producción de ERO por macrófagos peritoneales en la RIP en los grupos tratados con fucoïdan de *L. trabeculata* (G1 y G2) es mayor que en los grupos tratados con *F. vesiculosus* (G3) y solución salina (G4). De manera similar, El-Boshy *et al.*, (2014) observaron que macrófagos de individuos de *Clarias gariepinus* tratados con fucoïdan de *Laminaria japónica* produjeron mayor ERO. Traifalgar *et al.*, (2013) observaron que en hemocitos de *Penaeus monodon* tratados con fucoïdan de *F. vesiculosus* presentaron mayor producción de ERO, lo cual no se observó en esta investigación.

Estos resultados distintos se pueden deber a las diferencias entre los modelos utilizados (especies), dosis (2 g/kg de pc vs la nuestra 5 y 10 mg/kg de pc) y los tratamientos (tipo de fucoïdan e intervalo entre dosis). La composición del fucoïdan puede variar entre grupos taxonómicos de algas pardas y ello puede conferir propiedades distintas, por ejemplo: la presencia de diferentes azúcares en diferentes proporciones dentro del fucoïdan (Skriptsova, 2015), tamaño y la cantidad de grupos sulfatos (Kawashima *et al.*, 2011). Estas posibles diferencias podrían explicar la diferente capacidad del fucoïdan de *F. vesiculosus* y *L. trabeculata* para inducir la producción de ERO. Adicionalmente a las pruebas *in vivo* mencionadas, Choi *et al.*, (2005) observaron que macrófagos peritoneales tratados *in vitro* con fucoïdan de *F. vesiculosus* tuvieron mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una ERO.

En la RIS, la producción de ERO no mostró diferencias significativas entre grupos. Esto se le podría corresponder al agotamiento del Ag debido a: 1) la mayor activación de macrófagos, demostrada en la RIP, y/o 2) participación de la respuesta inmune adaptativa generada en la RIP. Con la rápida eliminación del Ag, demostrada por los resultados de fagocitosis mediada por anticuerpos, la activación de los macrófagos y la producción de ERO pudo darse a solo algunos días después de la segunda inmunización. Por lo que 2 semanas después de la última inoculación de GRC, la producción de ERO fue mínima y similar entre los diferentes grupos.

La producción de ERO se caracteriza por su manifestación rápida y duración corta, contrario a la producción de ERN (Vazquez *et al.*, 2000). Esto se evidencia claramente con la aún presente, pero menos intensa, producción de ERN en la RIS en comparación con la RIP para los grupos tratados con fucoidan de *L. trabeculata*. Entonces, la evaluación del efecto del fucoidan sobre la producción de ERO en la RIS podría requerir análisis pocos días después a la última inmunización para detectar diferencias. Además, se ha demostrado que el fucoidan puede tener efectos pleiotrópicos sobre las funciones de los monocitos, los cuales son precursores de los macrófagos (Italiani y Boraschi, 2014). Sapharikas *et al.*, (2015) observaron que el tratamiento con fucoidan en monocitos de sangre periférica mejoró su capacidad de adhesión y migración. En adición, la producción de ERO a su vez es importante para la diferenciación de monocitos a macrófagos (Xu *et al.*, 2016).

La producción de ERO también puede ser indirectamente modulada por la presencia de anticuerpos. Gallo *et al.*, (2010) observaron que la cantidad de IgG podía modular de manera directamente proporcional la producción de IL-10 por macrófagos. Esta posee efecto inhibitorio en la producción de ERO (Dokka *et al.*, 2001), sin afectar la fagocitosis de GRC (Gallo *et al.*, 2010), lo cual pudo observarse en los resultados de la presente investigación.

En la producción de ERN se observó que el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata* tuvo efecto estimulador de forma dosis-dependiente ( $G1 < G2$ ) en la RIP y RIS. Trabajos similares *in vivo* son muy escasos. Jeong *et al.*, (2015) observaron que macrófagos murinos tratados *in vitro* con extracto de *Hizikia fusiforme* produjeron NO de forma dosis-dependiente. Choi *et al.*, (2005) demostraron *in vitro* que macrófagos peritoneales murinos tratados con fucoidan de *Fucus vesiculosus* presentaron mejor capacidad productora de ERN y ERO. Takeda *et al.*, (2012) vieron que el tratamiento de macrófagos *in vitro* con fucoidan de *Cladosiphon okamuranus Tokida* aumentó la secreción de NO de manera proporcional al tiempo y concentración. Kar *et al.*, (2011) observaron que el tratamiento de macrófagos

peritoneales *in vitro* con fucoidan induce la mayor producción de nitritos, junto a la expresión de iNOS. En contraste, Lee *et al.*, (2012) observaron *in vitro* disminución de la producción de NO con el aumento de dosis. De igual forma Hwang *et al.*, (2011) observaron que el tratamiento *in vitro* con el polisacárido sulfatado de *Sargassum hemiphyllum* sobre macrófagos murinos redujo la secreción de NO y expresión de iNOS. Estas diferencias pueden deberse a las características químicas distintas entre fucoidan de diferentes algas pardas (Skriptsova, 2015; Kawashima *et al.*, 2011), además de las características del tratamiento mismo.

La producción de ERO y ERN son procesos importantes que pueden actuar en sinergia durante la respuesta del macrófago a estímulos y pueden ser regulados entre sí (Wink *et al.*, 2011; Formand y Torres, 2001). La producción de ERO y ERN requiere la utilización de NADPH y O<sub>2</sub>, lo que implica competencia por estos sustratos. Sin embargo, la generación de ERN también da como producto radicales hidroxilo (ERO) (Formand y Torres, 2001). El NO puede reaccionar con peróxido de hidrógeno, dándole capacidad antioxidante (Wink *et al.*, 2011). Vazquez *et al.*, (2000) observaron que los macrófagos de ratones knock-out para la iNOS produjeron mayor cantidad de ERO y por periodos más prolongados que ratones wild-type. Esto sugiere que la producción de ERO y ERN es regulada entre estos procesos, y estos pueden ser modulados a su vez mediante el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata*.

El efecto del fucoidan sobre estas funciones de los macrófagos peritoneales pudo darse directamente y/o indirectamente, por ejemplo, mediante la estimulación de sus receptores de membrana o mediante la participación de señales provenientes de otras células, respectivamente.

Los macrófagos y las DCs presentan una variedad de receptores de membrana capaces de reconocer moléculas y modular su actividad. Un grupo de receptores presentes en estas

poblaciones celulares son los receptores tipo toll (TLR), y entre ellos los TLR 2 y 4 (Pauwels *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el TLR 2 y 4 provenientes de humanos son capaces de reconocer moléculas de fucoidan de diferentes algas pardas (Makarenkova *et al.*, 2012).

En ratones se ha observado que el fucoidan es ligando del receptor scavenger de clase A (SR-A o CD204), y su unión mejora la activación de macrófagos con LPS mediado por TLR 4 (Yu *et al.*, 2012). Además a ello, Yi *et al.*, (2011) observaron que el SR-A podía modular la respuesta en DCs. Este estímulo *in vivo* es posible ya que se ha demostrado en ratas que el fucoidan es capaz de ser absorbido y transportado a diferentes tejidos (Nagamine *et al.*, 2014). Similarmente, Tokita *et al.*, (2010) detectaron fucoidan en suero de personas que lo habían ingerido. Esto indica que el fucoidan puede modular la respuesta inmune innata celular, como lo observado en macrófagos, lo que sugiere su capacidad de regular la respuesta inmune adaptativa, en la cual las DCs son importantes iniciadoras.

La activación y generación de LT efectores depende de las DC, las cuales poseen receptores que pueden interactuar con el fucoidan, como se mencionó anteriormente. Jin *et al.*, (2014) observaron que el tratamiento con fucoidan indujo mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias y maduración de esta población celular, mejorando su capacidad presentadora de Ag, evidenciándose en la estimulación de la producción de anticuerpos y generación de LT específicos al Ag.

De manera similar, Kim y Joo, (2008) observaron que el fucoidan de *F. vesiculosus* incrementó la viabilidad de DCs, producción de citoquinas y expresión de receptores. Yang *et al.*, (2008) observaron que el tratamiento con fucoidan sobre DCs derivadas de monocitos humanos indujo su maduración, producción de citoquinas pro-inflamatorias y promovió su capacidad polarizante de tipo Th1. La participación de LT en este trabajo se puede suponer por la activación de macrófagos, fagocitosis mediada por anticuerpos y expresión transcripcional de citoquinas por esplenocitos. La generación de NO depende de la expresión



de la iNOS, y esta requiere la estimulación del macrófago mediante citoquinas como interferón- $\gamma$  (Torre *et al.*, 2002), la cual puede provenir de Th1 (Yang *et al.*, 2008). Kim *et al.*, (2015) observaron que el tratamiento de esplenocitos con fucoidan aumenta la expresión de marcadores de activación de respuesta inmune, como el MHC II y la población de células plasmáticas. Lebedynskaya *et al.*, (2015) observaron que el tratamiento *in vivo* con fucoidan de *L. japonica* via i.p. indujo mayor expresión de marcadores de inmunidad innata y adaptativa sobre leucocitos, por ejemplo CD19, MHCII, TLR2, TLR4, entre otros.

En adición a ello, Xiaolin *et al.*, (1995) observaron que el fucoidan es capaz de mejorar las funciones de LT y LB, macrófagos y células NK; además de promover la RIP de anticuerpos anti-GRC. Además de los macrófagos y DCs, los LB también representan una población de APC susceptible a ser modulada por el fucoidan. Estas células expresan TLR2 y 4 (Buchta y Bishop, 2014) y debido a su capacidad de poder interactuar con moléculas de fucoidan (Makarenkova *et al.*, 2012), se puede esperar que este compuesto funcione como adyuvante para la activación de LB, y consiguiente diferenciación en células productoras de anticuerpos (Abbas *et al.*, 2014).

Los resultados de fagocitosis mediada por anticuerpos indican que el grupo G2 presentó valores mayores en comparación con el resto de grupos, no siendo estadísticamente significativo al comparar con el grupo tratado con *F. vesiculosus*. Esto se puede deber a la mayor activación del macrófago y/o la producción de IgG. El-Boshy *et al.*, (2014) demostraron que el tratamiento *in vivo* con fucoidan de *Laminaria japonica* de individuos de *Clarias gariepinus* estimuló la fagocitosis de macrófagos. Similarmente, Kawashima *et al.*, (2011) observaron que la fagocitosis de bacterias por macrófagos fue mayor en aquellos tratados con fucoidan de *Undaria pinnatifida*. Traifalgar *et al.*, (2013) determinaron que hemocitos de *Penaeus monodon* tratados con fucoidan de *F. vesiculosus* presentaron mayor índice de fagocitosis. Halling *et al.*, (2015) demostraron la estimulación de la fagocitosis de

macrófagos tratados con fucoidan de *Laminaria hyperborea*. Choi *et al.*, (2005) observaron que macrófagos peritoneales tratados *in vitro* con fucoidan de *F. vesiculosus* tuvieron mayor actividad fagocítica. Estos antecedentes sugieren que la fagocitosis puede ser estimulada por el fucoidan de diferentes algas. No obstante, la fagocitosis mediada por anticuerpos también depende de la generación de IgG, el cual es producido en mayor cantidad durante una RIS manifestándose con la formación de rosetas Fc (Ichika *et al.*, 1985). Takai *et al.*, (2014) demostraron que el cultivo de esplenocitos con fucoidan de *Undaria pinnatifida* indujo mayor producción de diferentes isotipos, entre ellos la IgG. Similarmente, Okai *et al.*, (1996) observaron que el tratamiento *in vitro* de esplenocitos con fucoidan de *Laminaria japonica* indujo mayor producción de IgG de forma dosis dependiente.

Hayashi *et al.*, (2007) concluyeron que el tratamiento vía oral con fucoidan de *Undaria pinnatifida* en ratones post-infección con virus de influenza indujo mayor producción de anticuerpos neutralizantes a los 14 días. No obstante, no se observaron diferencias significativas en la producción de IgG. Omar *et al.*, (2013) vieron en ratas que la reducción de la producción de IgG causada por el tratamiento con ciclosporina era aminorada con el tratamiento con fucoidan. Jin *et al.*, (2014) observaron que el fucoidan de *F. vesiculosus* co-administrado intraperitonealmente con ovoalbúmina mejoró la producción de IgG1 e IgG2a. Los resultados en la producción de hemaglutininas, las cuales son predominantemente IgM, indican que no hay diferencias significativas entre los grupos en la RIP y RIS. No obstante, se pudo observar en la RIP que el grupo tratado con fucoidan de *L. trabeculata* tendió a tener menores valores que el grupo tratado con fucoidan de *F. vesiculosus*.

Similarmente, Hayashi *et al.*, 2007 no observaron diferencias significativas en la producción de IgM. Omar *et al.*, (2013) determinaron que ratas tratadas con ciclosporina y fucoidan de *F. vesiculosus* presentaban menor cantidad de IgM en comparación al grupo tratado sin fucoidan con o sin ciclosporina. Contrariamente, Halling *et al.*, (2015) observaron que

ratones tratados oralmente con fucoidan de *Laminaria hyperborea* con dosis de fucoidan de 1.7 y 5 mg/kg de p.c. presentaron títulos mayores de anticuerpos anti-ovoalbúmina inoculada i.p. Además, estos 2 grupos con diferentes dosis no tuvieron diferencia significativa entre sí, similar a lo observado en este trabajo.

Xiaolin *et al.*, (1995) observaron que el fucoidan es capaz de promover la RIP de anticuerpos anti-GRC. Kim *et al.*, (2015) observaron que la producción de anticuerpos séricos específicos era mayor en ratones inmunizados con *Mycoplasma hyopneumoniae* en conjunto con fucoidan. Okai *et al.*, (1996) concluyeron que el tratamiento *in vitro* de esplenocitos con fucoidan de *Laminaria japonica* indujo mayor producción de IgM de forma dosis dependiente. De forma similar, Takai *et al.*, (2014) observaron que el cultivo de esplenocitos con fucoidan de *Undaria pinnatifida* indujo mayor producción de anticuerpos IgM.

Vetvicka y Vetvickova (2017) observaron que el tratamiento intraperitoneal de diferentes fuentes de fucoidan indujo mayor producción de anticuerpos séricos específicos. En la RIS no se observaron diferencias entre los tratamientos. Esto se debe a que la IgM, el mejor isotipo hemaglutinante, es predominante en la respuesta inmune primaria, en donde se observan más diferencias entre grupos tratados con fucoidan. Esto sugiere que se debería complementar el análisis de la respuesta inmune humoral adaptativa mediante la titulación de los anticuerpos anti-GRC de isotipo IgG, ya sea en la RIP o RIS. Es posible que el fucoidan de *L. trabeculata* este acelerando el switch isotípico y por lo tanto la cantidad de IgG específica producida en la RIP (Juto y Settergren, 1988) puede ser mayor y estar agotando los epítopes disponibles reconocibles por la IgM y en consecuencia, reduciendo la aglutinación.

Los GRC fueron inoculados en la cavidad peritoneal y puede ser transportado a órganos linfoides secundarios, por ejemplo el bazo, en donde se desarrolla la respuesta inmune adaptativa (Terasawa *et al.*, 2008; Yanase *et al.*, 2009). Por esta razón se realizó el análisis

de expresión transcripcional por esplenocitos de algunas citoquinas relacionadas a la respuesta humoral. Los resultados indican que el fucoideano de *L. trabeculata* induce la transcripción de distintas citoquinas en esplenocitos en la RIP y RIS.

La expresión de IL-4 fue mayor en los grupos tratados con fucoideano de *L. trabeculata* en la RIP y RIS. Interesantemente, el grupo G3 presentó valores similares al G4 en la RIP y al tratado con fucoideano de *L. trabeculata* en la RIS. Esto en conjunto indica que el fucoideano de *L. trabeculata* posee capacidad de modular positivamente la expresión de esta citoquina en esplenocitos en la RIP o RIS. En un estudio similar, Jin *et al.*, (2014) observaron que no hubo diferencias en la transcripción de IL-4 entre el grupo tratado con *F. vesiculosus* y PBS. Yanase *et al.*, (2009) observaron que la producción de IL-4 por esplenocitos, de ratones inmunizados con OVA y tratados i.p. con fucoideano presentaron menor producción de IL-4 luego del re-enfrentamiento a OVA *in vitro*. Los resultados de la expresión de IL-4 en conjunto a los de la fagocitosis mediada por anticuerpos sugieren que la IL-4 estimulada por el tratamiento con fucoideano podría mediar el aumento de IgG. Fort *et al.*, (2001) observaron que la producción de anticuerpos IgG1 aumentaba en ratones con mayor transcripción de IL-4, IL-5 e IL-13 en bazo.

Como se ha expuesto previamente, la expresión transcripcional de IL-5 fue detectable solo en los grupos tratados con fucoideano de *L. trabeculata* en la RIP. Interesantemente, solo se observó expresión en los grupos G1 y G3 en la RIS. Los estudios del efecto del fucoideano sobre la expresión de IL-5 son pocos. Maruyama *et al.*, (2005) observaron que ratones nebulizados con OVA y tratados intraperitonealmente con fucoideano redujo la cantidad de citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el fluido de lavado broncoalveolar. Pese a las diferencias en la metodología entre dicho trabajo y este, la expresión de esta citoquina y otras, puede diferir entre órganos y depender del momento en que se analicen (Liu *et al.*, 2017). La IL-5 es parte del grupo de citoquinas Th2. Este grupo de células requieren la

activación de GATA-3, el cual es un factor de transcripción maestro que induce la diferenciación de los LT vírgenes en Th2. Se ha descrito que este perfil de citoquinas secretadas ocurre por el remodelamiento de la cromatina en los loci de *il4*, *il5* e *il13* y los sitios de unión de GATA-3 al DNA (Nakayama *et al.*, 2017). Además a ello, la expresión de estas citoquinas Th2 también pueden ser estimulada por IL-25 (Fort *et al.*, 2001). Entonces, estos mecanismos de regulación podrían ser dianas candidatas a ser moduladas por el fucoidan. Los resultados muestran un comportamiento similar entre IL-4 e IL-5 en la RIP, lo cual se puede deber a la similar regulación mediada por GATA-3. No obstante, esta similitud se pierde en la RIS. Esto puede ser por la expresión de IL-4 por LT foliculares, los cuales dependen del factor de transcripción Bcl-6 (Meli *et al.*, 2017). La importancia de la IL-5, junto a la IL-6 e IL-10, fue demostrado por Strestik *et al.*, (2001) quienes observaron que ratones knock-out para IL-6 e IL-10 presentaron mayor carga viral en el bazo en la RIP dos semanas después del enfrentamiento con el virus de leucemia murina. Y, luego de una segunda exposición, los ratones knock-out para IL-5 e IL-6 presentaron títulos menores de anticuerpos neutralizantes y del tipo IgG. Indicando su importancia de estas 2 citoquinas en la producción de anticuerpos.

En la RIP, se observó que la expresión transcripcional de IL-6 fue mayor en los grupos tratados con fucoidan de *L. trabeculata*, y casi imperceptible en el resto de grupos. En contraste, en la RIS se encontró expresión de esta citoquina en todos los grupos, siendo aparentemente mayor en los grupos tratados con fucoidan de *L. trabeculata*, lo cual se puede relacionar con una mayor producción de anticuerpos sugerida por la fagocitosis mediada por anticuerpos. Jin *et al.*, (2014) observaron que el fucoidan de *F. vesiculosus* indujo mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas la IL-6. Además observaron aumento en la producción de IgG1 e IgG2a del grupo tratado. Omar *et al.*, (2013) observaron que ratas tratadas con ciclosporina poseían menor cantidad de IL-6 en suero, este efecto se redujo

con el tratamiento con fucoidan subcutáneamente y elevó los niveles similares al grupo sin ciclosporina; y a su vez aminorando la reducción en la producción de IgG. Yoo *et al.*, (2007) estimularon esplenocitos con fucoidan de *Undaria pinnatifida*, y observaron mayor producción de IL-6 en comparación con células tratadas con fucoidan de *F. vesiculosus* y sin tratar, similar a lo visto en este trabajo pero con fucoidan de *L. trabeculata*. Lebedynskaya *et al.*, (2015) observaron que ratones tratados con una dosis de fucoidan de *L. japonica* i.p. presentaron mayor concentración de IL-6 en suero, disminuyendo con el paso del tiempo, pero siempre mayor al control. Cassese *et al.*, (2003) observaron que la IL-6 juega un papel importante en la inducción de producción de anticuerpos IgG específicos, pero no para el mantenimiento de estos, observándose los mismos valores en ratones knock-out y wild type para esta citoquina a partir de la 2<sup>da</sup> semana luego del booster. Esto se relaciona con los resultados en donde observamos la expresión de esta citoquina relativamente mayor en el grupo con mayor fagocitosis mediada por anticuerpos. Adicionalmente, Cassese *et al.*, (2003) observaron que esta citoquina promovía la supervivencia de células plasmáticas.

La IL-10 es conocida principalmente por ser una citoquina reguladora e inhibidora de la respuesta inflamatoria, además de participar en la generación de la respuesta inmune humoral. Los resultados indican que el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata* indujo mayor expresión transcripcional en la RIP. En contraste, en la RIS se observó menor expresión en el grupo G2, siendo similar entre G1 y G3, y mayores que el grupo tratado con solución salina (G4). Es interesante notar que la expresión de IL-5 e IL-10 fue similar en la RIP y RIS. Esto puede deberse a que la expresión de IL-5 puede depender de la función de IL-10, como lo demostró Yang *et al.*, (2000). No obstante, cómo el fucoidan pudo afectar a estas citoquinas y variar entre RIP y RIS aún debe ser revelado. Los trabajos sobre el efecto del fucoidan en la expresión de IL-10 por esplenocitos son escasos. Kar *et al.*, (2011)

utilizaron ratones infectados con distintas cepas de *Leishmania donovani* los cuales fueron tratados con fucoidan post-infección y observaron que no hubo diferencias en la producción de IL-10 por esplenocitos extraídos luego de 2 semanas de tratamiento. No obstante, encontraron reducción en el grupo infectado tratado con fucoidan 4 semanas post-infección. El bazo es un órgano que contiene poblaciones celulares diversas, como linfocitos, macrófagos, DCs, células reticulares, monocitos, entre otros (Cesta, 2006; Swirski *et al.*, 2009). Por ello, el efecto del fucoidan en la producción de IL-10 sobre estas poblaciones puede ser relevante. Mytar *et al.*, (2004) observaron que el tratamiento de monocitos con fucoidan mejoró la expresión de esta citoquina a nivel transcripcional y traduccional. Stefaniak *et al.*, (2017) observaron que macrófagos tratados con fucoidan de *Laminaria spp.* produjeron mayor cantidad de IL-10 junto con la IL-6. Similarmente, Vetvicka y Vetvickova, (2017) observaron que el tratamiento *in vitro* de macrófagos con diferentes fuentes de fucoidan indujo mayor producción de IL-10 y TNF- $\alpha$ . Pese a su relación con la respuesta humoral (Komai *et al.*, 2018), el efecto de esta citoquina sobre esta respuesta a nivel global depende de la intervención de otras citoquinas. Esta citoquina como se ha mencionado tiene propiedades reguladores controlando la respuesta inmune. Como lo esperado, en la RIP se observó que esta citoquina se expresó de forma similar a la IL-6, una citoquina pro-inflamatoria, sugiriendo su papel regulatorio frente a una respuesta inflamatoria. Su expresión en la RIS sugiere que podría tener un papel durante la producción de anticuerpos independiente de su nivel de expresión, y/o sugiriendo a su vez que otras citoquinas, por ejemplo: IL-4 o IL-6, podrían tener un papel predominante en el aumento de producción de anticuerpos. Además, se observó en este contexto que el grupo G2 presentó mayor expresión de IL-6 junto a la menor expresión de IL-10. Wang *et al.*, (2016) observaron que ratones con diabetes tipo 2 tratados con fucoidan de *Acaudina molpadioides* presentaron disminución de IL-6 y aumento de IL-10 en suero.

Además del análisis de expresión transcripcional, se encontró que la concentración de IL-10 en suero fue menor a 128 pg/mL calculado por el mínimo valor detectable por la curva de calibración (32 pg/mL) y la dilución de la muestra (1:4). Wang *et al.*, (2016) cuantificaron las concentraciones de IL-10 en suero mediante kits de Invitrogen entre 73-124 pg/mL. Gotoh *et al.*, (2012) observaron niveles de IL-10 en el rango de  $30.5 \pm 4.8$  pg/mL. Estas concentraciones mencionadas estuvieron por debajo de 128 pg/mL, lo que puede explicar la falta de detección.

Esto sugiere que el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata* no aumentó la concentración de IL-10 en suero por encima de 128 pg/mL. Es importante mencionar que la concentración de esta citoquina en sangre depende de otras fuentes celulares, como monocitos y neutrófilos (Iyer *et al.*, 2012), además células del hígado y pulmón (Bouabe *et al.*, 2011). Estas fuentes pueden ser responsables de la mayor producción vista en otro tipo de trabajos, las cuales pudieron no haber sido afectadas por el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata*. No se encontró relación directa entre la síntesis de mRNA de IL-10 en esplenocitos y los niveles de esta citoquina en suero, lo que sugiere que la inducción de la expresión de esta citoquina podría estar limitada al bazo, sin descartar el efecto de la dilución durante la detección de IL-10 sérica.



## **VII. CONCLUSIONES**

1. El tratamiento por vía oral con fucoidan en la dosis de 10 mg/kg de p.c. estimula parámetros de la inmunidad innata como la producción de especies reactivas de oxígeno en la respuesta inmune primaria, y la producción de especies reactivas de nitrógeno en la respuesta inmune primaria y secundaria, en macrófagos peritoneales.
2. El tratamiento por vía oral con fucoidan en dosis de 10 mg/kg de p.c. estimula la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales en la respuesta inmune secundaria.
3. El fucoidan no afecta el título de anticuerpos hemaglutinantes, así como tampoco influyó en el incremento de IL-10 sérica, tanto en la respuesta inmune primaria como secundaria.
4. En los esplenocitos de ratones tratados con 10 mg/kg de p.c., el fucoidan estimula la expresión transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 en la respuesta inmune primaria; induce la expresión de IL-4 e IL-6, y reduce la expresión de IL-5 e IL-10 en la respuesta inmune secundaria; lo que significa que su mayor efecto estimulador está en la inmunidad humoral adaptativa.
5. Los cambios que se presentan en la expresión transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 no se relacionan con la producción de anticuerpos hemaglutinantes, tanto en la respuesta inmune primaria como en la secundaria para las dosis evaluadas.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

1. Utilizar un extracto de fucoidan de *L. trabeculata* con más pureza (>81%).
2. Evaluar la producción de ERO en la respuesta inmune secundaria en un tiempo menor a 2 semanas luego del re-enfrentamiento con GRC.
3. Evaluar la producción de IgG anti-GRC mediante un ensayo de ELISA.
4. Realizar el análisis de IL-10 mediante ELISA con sueros sin diluir.
5. Estudiar el efecto del fucoidan sobre DCs.
6. Realizar cuantificación de la expresión transcripcional mediante RT-qPCR

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. Cellular and molecular immunology E-book. Elsevier Health Sciences, 2014.
- ABOOD, W. N. Immunomodulatory and Natural Immunomodulators. J Allergy Inflamm, 2017, vol. 1, p. e101.
- AHN, Ginnae, et al. Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. Marine Biotechnology, 2008, vol. 10, no 3, p. 278-289.
- AKDIS, Mübeccel, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016, vol. 138, no 4, p. 984-1010.
- ALE, Marcel Tutor, et al. Fucoïdan from *Sargassum sp.* and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. International journal of biological macromolecules, 2011, vol. 49, no 3, p. 331-336.
- ANTIABONG, John F.; NGOEPE, Mafora G.; ABECHI, Adakole S. Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. Veterinary world, 2016, vol. 9, no 9, p. 935.
- ARANGO RINCÓN, Julián Camilo; GÁMEZ DÍAZ, Laura Yaneth; LÓPEZ QUINTERO, Juan Álvaro. NADPH oxidase system: new challenges and perspectives. Iatreia, 2010, vol. 23, no 4, p. 362-372.

- BARCLAY, A. Neil; VAN DEN BERG, Timo K. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annual review of immunology*, 2014, vol. 32, p. 25-50.
- BASCONES-MARTINEZ, Antonio, et al. Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*, 2014, vol. 19, no 1, p. e24.
- BOHN, Erwin, et al. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. *Infection and immunity*, 1994, vol. 62, no 7, p. 3027-3032.
- BOUABE, Hicham, et al. Novel Highly Sensitive IL-10– $\beta$ -Lactamase Reporter Mouse Reveals Cells of the Innate Immune System as Substantial Source of IL-10 In Vivo. *The Journal of Immunology*, 2011, p. 1101477.
- BOUSFIHA, Ahmed Aziz, et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *Journal of clinical immunology*, 2013, vol. 33, no 1, p. 1-7.
- BRODEUR, Bernard R.; MERIGAN, Thomas C. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. *The Journal of Immunology*, 1974, vol. 113, no 4, p. 1319-1325.
- BUCHTA, Claire M.; BISHOP, Gail A. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunologic research*, 2014, vol. 59, no 1-3, p. 12-22.
- CAJA, Víctor, et al. Obtención de ácido algínico a partir del alga *Lessonia trabeculada*. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, vol. 7, no 2, p. 9-13.
- CASSESE, Giuliana, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *The Journal of Immunology*, 2003, vol. 171, no 4, p. 1684-1690.

- CESTA, Mark F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 2006, vol. 34, no 5, p. 455-465.
- CHAVEZ, JORGE, APUMAYTA, EDER, LOAYZA, LILLYAN, CASIMIRO, SANDRA and RABANAL, MELISSA, 2017, Screening fitoquímico y contenido de elementos traza del alga parda *Lessonia trabeculata* procedente de la bahía de San Nicolas de Marcona, Ica - Perú. [online]. Lima: VI Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal. [Accessed 2 January 2019]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/321476850\\_Asentamiento\\_de\\_Carpoesporas\\_de\\_Chondracanthus\\_chamissoi\\_sobre\\_cuerdas\\_de\\_Polietileno\\_Cabo\\_Papelillo\\_en\\_Condiciones\\_semi\\_Controladas\\_de\\_Laboratorio](https://www.researchgate.net/publication/321476850_Asentamiento_de_Carpoesporas_de_Chondracanthus_chamissoi_sobre_cuerdas_de_Polietileno_Cabo_Papelillo_en_Condiciones_semi_Controladas_de_Laboratorio)
- CHINEN, Javier; SHEARER, William T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, vol. 125, no 2, p. S195-S203.
- CHOI, Eun-Mi, et al. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. *Journal of medicinal food*, 2005, vol. 8, no 4, p. 446-453.
- CHOJNACKA, Katarzyna, et al. Biologically active compounds in seaweed extracts—the prospects for the application. En *The open conference proceedings journal*. 2012. p. 20-28.
- CIAGLIA, Elena, et al. Immuno-Modulatory and Anti-Inflammatory Effects of Dihydrogracilin A, a Terpene Derived from the Marine Sponge *Dendrilla membranosa*. *International journal of molecular sciences*, 2017, vol. 18, no 8, p. 1643.
- COLONA, Erasmo H., et al. Immunomodulatory activity of an extract from *Lessonia trabeculata* on human peripheral blood mononuclear cells. En *Front. Immunol. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015—11th Congress of the Latin*

American Association of Immunology–10°. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología. 2015.

- CRAIG, Charles R.; STITZEL, Robert E. (ed.). Modern pharmacology with clinical applications. Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
- DHAWAN, Veena. Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations. En Studies on Respiratory Disorders. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 27-47.
- DOKKA, Sujatha, et al. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2001, vol. 280, no 6, p. L1196-L1202.
- EDWARDS, Alexander D., et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. European journal of immunology, 2003, vol. 33, no 4, p. 827-833.
- EL-BOSHY, Mohamed, et al. Dietary fucoidan enhance the non-specific immune response and disease resistance in African catfish, *Clarias gariepinus*, immunosuppressed by cadmium chloride. Veterinary immunology and immunopathology, 2014, vol. 162, no 3-4, p. 168-173.
- FLETCHER, H. R., et al. The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. Algal research, 2017, vol. 22, p. 79-86.
- FORMAN, Henry Jay; TORRES, Martine. Redox signaling in macrophages. Molecular aspects of medicine, 2001, vol. 22, no 4-5, p. 189-216.
- FORT, Madeline M., et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. Immunity, 2001, vol. 15, no 6, p. 985-995.

- GALLO, Paul; GONÇALVES, Ricardo; MOSSER, David M. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunology letters*, 2010, vol. 133, no 2, p. 70-77.
- GATLIN, Delbert M. *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. Cabi, 2007.
- GOTOH, Koro, et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. *Diabetes*, 2012, p. DB\_111688.
- GRANDO, F. C. C., et al. Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2009, vol. 42, no 7, p. 599-605.
- GRAY, G. D.; PHILLIPS, R. S. Suppression of primary and secondary antibody responses and inhibition of antigen priming during *Babesia microti* infections in mice. *Parasite immunology*, 1983, vol. 5, no 2, p. 123-134.
- GRUND, Lidian Zito, et al. IL-5 and IL-17A are critical for the chronic IgE response and differentiation of long-lived antibody-secreting cells in inflamed tissues. *Cytokine*, 2012, vol. 59, no 2, p. 335-351.
- GUIRY, WENDY and GUIRY, G.M., 2019, *Lessonia trabeculata* Villouta and Santelices. *Algaebase.org* [online]. 2019. [Accessed 12 January 2019]. Available from: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=12164](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=12164)
- GUTHMILLER, Jenna J., et al. Cutting edge: IL-10 is essential for the generation of germinal center B cell responses and anti-plasmodium humoral immunity. *The Journal of Immunology*, 2017, vol. 198, no 2, p. 617-622.
- HALLING, B. P.; VETVICKA, V.; BLAKEMORE, W. R. Evaluation of The Immunomodulatory *In vivo* Activity of *Laminaria Hyperborea* Fucoidan Relative to

- Commercial (1, 3/1, 6)-B-D-Glucans from Yeast and Mushrooms. Journal of Nutrition and Health Sciences, 2015, vol. 2, no 2, p. 1.
- HAYASHI, Toshimitsu, et al. Promising antiviral Glyco-molecules from an edible alga. John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, 2007.
  - HIRAYAMA, Daisuke; IIDA, Tomoya; NAKASE, Hiroshi. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. International journal of molecular sciences, 2017, vol. 19, no 1, p. 92.
  - HUANG, Qianqian, et al. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. Animal Nutrition, 2018, vol. 4, no 2, p. 137-150.
  - HWANG, Pai-An, et al. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, vol. 59, no 5, p. 2062-2068.
  - ICHIKI, A. T.; WUST, C. J.; LOZZIO, C. B. Characterization of the Fc (IgG) receptor on the pluripotential leukaemia cell K-562. Clinical and experimental immunology, 1985, vol. 59, no 1, p. 64.
  - ITALIANI, Paola; BORASCHI, Diana. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. Frontiers in immunology, 2014, vol. 5, p. 514.
  - ITOH, Kenji, et al. The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. Cellular immunology, 1994, vol. 157, no 2, p. 478-488.



- IYER, Shankar Subramanian; CHENG, Gehong. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 2012, vol. 32, no 1.
- JANTAN, Ibrahim; AHMAD, Waqas; BUKHARI, Syed Nasir Abbas. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in plant science*, 2015, vol. 6, p. 655.
- JEONG, Sang Chul, et al. Immune-modulating activities of polysaccharides extracted from brown algae *Hizikia fusiforme*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2015, vol. 79, no 8, p. 1362-1365.
- JIN, Jun-O., et al. Fucoidan can function as an adjuvant *in vivo* to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. *PloS one*, 2014, vol. 9, no 6, p. e99396.
- KAR, Susanta; SHARMA, Gunjan; DAS, Pijush K. Fucoidan cures infection with both antimony-susceptible and-resistant strains of *Leishmania donovani* through Th1 response and macrophage-derived oxidants. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2011, vol. 66, no 3, p. 618-625.
- KAWASHIMA, Tadaomi, et al. A sulfated polysaccharide, fucoidan, enhances the immunomodulatory effects of lactic acid bacteria. *International journal of molecular medicine*, 2012, vol. 29, no 3, p. 447-453.
- KAWASHIMA, Tadaomi. A marine carotenoid, fucoxanthin, induces regulatory T cells and inhibits Th17 cell differentiation in vitro. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2011, vol. 75, no 10, p. 2066-2069.
- KIM, Mi-Hyoung; JOO, Hong-Gu. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology letters*, 2008, vol. 115, no 2, p. 138-143.

- KIM, Su-Yeon; JOO, Hong-Gu. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *Journal of veterinary science*, 2015, vol. 16, no 2, p. 145-150.
- KOMAI, Toshihiko, et al. Transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-10 synergistically regulate humoral immunity via modulating metabolic signals. *Frontiers in Immunology*, 2018, vol. 9, p. 1364.
- LADICS, Gregory S. Primary immune response to sheep red blood cells (SRBC) as the conventional T-cell dependent antibody response (TDAR) test. *Journal of immunotoxicology*, 2007, vol. 4, no 2, p. 149-152.
- LAI, Rongrong, et al. Raf kinase inhibitor protein preferentially promotes TLR3-triggered signaling and inflammation. *The Journal of Immunology*, 2017, p. 1601672.
- LE MOINE, Alain, et al. Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection. *The Journal of clinical investigation*, 1999, vol. 103, no 12, p. 1659-1667.
- LEBEDYNSKAYA, E. A., et al. The effect of sulfated polysaccharides from brown seaweed *Laminaria japonica* on the morphology of lymphoid organs and functional characteristics of immunocompetent cells. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2015, vol. 9, no 1, p. 86-94.
- LEE, Seung-Hong, et al. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydrate polymers*, 2012, vol. 89, no 2, p. 599-606.
- LEENAARS, Marlies; HENDRIKSEN, Coenraad FM. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Ilar Journal*, 2005, vol. 46, no 3, p. 269-279.

- LEVINE, Seymour; SALTZMAN, Arthur. Increased hemagglutinins after intraperitoneal immunization in postinflammatory state. *Journal of immunological methods*, 1987, vol. 105, no 2, p. 179-182.
- LIU, Jinghua, et al. Screening cytokine/chemokine profiles in serum and organs from an endotoxic shock mouse model by LiquiChip. *Science China Life Sciences*, 2017, vol. 60, no 11, p. 1242-1250.
- LUKÁČ, N.; MASSÁNYI, P. Effects of trace elements on the immune system. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne*, 2007, vol. 56, no 1, p. 3-9.
- MAGGINI, Silvia, et al. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *British Journal of Nutrition*, 2007, vol. 98, no S1, p. S29-S35.
- MAKARENKOVA, I. D., et al. Sulfated polysaccharides of brown seaweeds are ligands of toll-like receptors. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2012, vol. 6, no 1, p. 75-80.
- MAŁACZEWSKA, J. The splenocyte proliferative response and cytokine secretion in mice after 28-day oral administration of silver nanocolloid. *Polish journal of veterinary sciences*, 2014, vol. 17, no 1, p. 27-35.
- MANTOVANI, B.; RABINOVITCH, M.; NUSSENZWEIG, V. Phagocytosis of immune complexes by macrophages: different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). *Journal of Experimental Medicine*, 1972, vol. 135, no 4, p. 780-792.
- MARUYAMA, Hiroko, et al. Suppression of Th2 immune responses by mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. *International archives of allergy and immunology*, 2005, vol. 137, no 4, p. 289-294.

- MELI, Alexandre P., et al. T Follicular Helper Cell–Derived IL-4 Is Required for IgE Production during Intestinal Helminth Infection. *The Journal of Immunology*, 2017, p. 1700141.
- MOSER, Muriel; LEO, Oberdan. Key concepts in immunology. *Vaccine*, 2010, vol. 28, p. C2-C13.
- MURRAY, Lesley J.; LEE, Rozanne; MARTENS, Christine. *In vivo* cytokine gene expression in T cell subsets of the autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *European journal of immunology*, 1990, vol. 20, no 1, p. 163-170.
- MYTAR, B., et al. Induction of intracellular cytokine production in human monocytes/macrophages stimulated with ligands of pattern recognition receptors. *Inflammation Research*, 2004, vol. 53, no 3, p. 100-106.
- NAGAMINE, Takeaki, et al. Intestinal absorption of fucoidan extracted from the brown seaweed, *Cladosiphon okamuranus*. *Marine drugs*, 2014, vol. 13, no 1, p. 48-64.
- NAKAYAMA, Toshinori, et al. Th2 cells in health and disease. *Annual review of immunology*, 2017, vol. 35, p. 53-84.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, et al. *Biologic markers in immunotoxicology*. National Academies Press, 1992.
- OKAI, Yasuji, et al. Detection of immunomodulating activities in an extract of Japanese edible seaweed, *Laminaria japonica* (Makonbu). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, vol. 72, no 4, p. 455-460.
- OMAR, Hossam El-Din M., et al. The immunomodulating and antioxidant activity of fucoidan on the splenic tissue of rats treated with cyclosporine A. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 2013, vol. 66, no 5, p. 243-254.

- OVERBERGH, Lut, et al. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, 1999, vol. 11, no 4, p. 305-312.
- OWEN, Judith A., et al. *Kuby immunology*. New York: WH Freeman, 2013.
- PARK, Jisang, et al. Fucoidan inhibits LPS-induced inflammation *in vitro* and during the acute response *in vivo*. *International immunopharmacology*, 2017, vol. 43, p. 91-98.
- PAUWELS, Anne-Marie, et al. Patterns, receptors, and signals: regulation of phagosome maturation. *Trends in immunology*, 2017, vol. 38, no 6, p. 407-422.
- PENG, Juan, et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine drugs*, 2011, vol. 9, no 10, p. 1806-1828.
- QUITRAL, Vilma, et al. Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista chilena de nutrición*, 2012, vol. 39, no 4, p. 196-202.
- REIKVAM, Åsmund. The Macrophage Response in mice after Primary and Secondary Immunization with Sheep Red Blood Cells. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section C Immunology*, 1976, vol. 84, no 3, p. 161-167.
- ROJAS, William, et al. *Inmunología de Rojas*. Corporacion para Investigaciones Biologicas (CIB), 2012.
- SANJEEWA, Kalu Kapuge Asanka, et al. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of brown seaweed *Sargassum horneri* in RAW 264.7 cells. *Nutrition research and practice*, 2017, vol. 11, no 1, p. 3-10.

- SAPHARIKAS, Elene, et al. Fucoidan stimulates Monocyte migration via ERK/p38 signaling pathways and MMP9 secretion. *Marine drugs*, 2015, vol. 13, no 7, p. 4156-4170.
- SAUSA, M. Perú: Hay 65,000 personas con VIH, pero solo la mitad tiene diagnóstico. Perú, 2014, vol. 21, p. 01.
- SHIMA, S., et al. IgM antibody production in mice intraperitoneally injected with zirconium oxychloride. *Occupational and Environmental Medicine*, 1987, vol. 44, no 9, p. 633-637.
- SKRIPTSOVA, A. V. Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russian Journal of Marine Biology*, 2015, vol. 41, no 3, p. 145-156.
- SONG, Lin, et al. Characterization and comparison of the structural features, immune-modulatory and anti-avian influenza virus activities conferred by three algal sulfated polysaccharides. *Marine drugs*, 2015, vol. 14, no 1, p. 4.
- STAMM, Claudia, et al. Dose-dependent induction of murine Th1/Th2 responses to sheep red blood cells occurs in two steps: antigen presentation during second encounter is decisive. *PloS one*, 2013, vol. 8, no 6, p. e67746.
- STEFANIAK–VIDARSSON, Magdalena M., et al. Evaluation of bioactivity of fucoidan from laminaria with in vitro human cell cultures (THP-1). *Functional Foods in Health and Disease*, 2017, vol. 7, no 9, p. 688-701.
- STRESTIK, Beatrice D., et al. The role of IL-5, IL-6 and IL-10 in primary and vaccine-primed immune responses to infection with Friend retrovirus (Murine leukaemia virus). *Journal of General Virology*, 2001, vol. 82, no 6, p. 1349-1354.
- SWIRSKI, Filip K., et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 2009, vol. 325, no 5940, p. 612-616.

- TAKAI, Mika, et al. The enhancing effect of fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2014, vol. 78, no 10, p. 1743-1747.
- TAKEDA, Kaori, et al. Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages. International journal of oncology, 2012, vol. 40, no 1, p. 251-260.
- TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors in innate immunity. International immunology, 2005, vol. 17, no 1, p. 1-14.
- TERASAWA, Masao; NAGATA, Kisaburo; KOBAYASHI, Yoshiro. Neutrophils and monocytes transport tumor cell antigens from the peritoneal cavity to secondary lymphoid tissues. Biochemical and biophysical research communications, 2008, vol. 377, no 2, p. 589-594.
- TOKITA, Yoshiharu, et al. Development of a fucoidan-specific antibody and measurement of fucoidan in serum and urine by sandwich ELISA. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2010, vol. 74, no 2, p. 350-357.
- TORRE, Donato; PUGLIESE, Agostino; SPERANZA, Filippo. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? The Lancet infectious diseases, 2002, vol. 2, no 5, p. 273-280.
- TRAIKALGAR, R. F. M.; CORRE, V. L.; SERRANO, A. E. Efficacy of dietary immunostimulants to enhance the immunological responses and Vibriosis resistance of juvenile *Penaeus monodon*. J Fish Aquat Sci, 2013, vol. 8, no 2, p. 340-52.
- ULETT, Glen C.; KETHEESAN, Natkunam; HIRST, Robert G. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. Infection and immunity, 2000, vol. 68, no 4, p. 2034-2042.

- VAZQUEZ, Monica I.; CATALAN-DIBENE, Jovani; ZLOTNIK, Albert. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*, 2015, vol. 74, no 2, p. 318-326.
- VAZQUEZ-TORRES, Andrés, et al. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 2000, vol. 192, no 2, p. 227-236.
- VETVICKA, Vaclav; VETVICKOVA, Jana. Fucoidans Stimulate Immune Reaction and Suppress Cancer Growth. *Anticancer research*, 2017, vol. 37, no 11, p. 6041-6046.
- WANG, Jinhui, et al. Fucoidan from *Acaudina molpadioides* protects pancreatic islet against cell apoptosis via inhibition of inflammation in type 2 diabetic mice. *Food Science and Biotechnology*, 2016, vol. 25, no 1, p. 293-300.
- WU, Guan-James, et al. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaefolium*. *Food Hydrocolloids*, 2016, vol. 53, p. 16-23.
- XIAOLIN, Yang, et al. An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan [j]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 1995, vol. 3, p. 002.
- XU, Qing, et al. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, p. jbc. M116. 731216.
- YANASE, Yuhki, et al. Peritoneal injection of fucoidan suppresses the increase of plasma IgE induced by OVA-sensitization. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009, vol. 387, no 3, p. 435-439.



- YANG, Meixiang, et al. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *International immunopharmacology*, 2008, vol. 8, no 13-14, p. 1754-1760.
- YANG, Xi, et al. IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction. *European journal of immunology*, 2000, vol. 30, no 2, p. 382-391.
- YI, Huanfa, et al. Targeting the immunoregulator SRA/CD204 potentiates specific dendritic cell vaccine-induced T cell response and antitumor immunity. *Cancer research*, 2011, p. canres. 1801.2011.
- YI, Tangsheng, et al. Splenic dendritic cells survey red blood cells for missing self-CD47 to trigger adaptive immune responses. *Immunity*, 2015, vol. 43, no 4, p. 764-775.
- YOO, Yung-Choon, et al. Immunomodulating activity of a fucoidan isolated from Korean *Undaria pinnatifida* sporophyll. *Algae*, 2007, vol. 22, no 4, p. 333-338.
- YU, Honghui, et al. Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2012, vol. 1823, no 7, p. 1192-1198.
- ZAVALA, José, et al. Evaluación poblacional de *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices, 1986 en San Juan de Marcona, Marzo 2010. 2015.

## X. ANEXOS

### Anexo 1. Constancia de Identificación de *L. trabeculata*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento Académico de Biología

La Molina, 02 de marzo de 2017

#### CONSTANCIA

03-2017-HM-UNALM

Mediante la presente se informa que la muestra de alga proveniente de la Bahía de San Nicolás, distrito de Marcona, provincia de Nazca, departamento de Ica, recolectada por Eder Valdir Apumayta Suárez, correspondiente al proyecto “Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoidano de algas pardas como suplemento nutricional para humanos”; convenio 143-PNICEP-PIAP-2015, ha sido estudiada en el Herbario “A. Weberbauer” del Dpto. de Biología (MOL) de la Universidad Nacional Agraria La Molina para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en dicho espécimen permiten concluir que el mismo corresponde a la siguiente especie:

#### Especie

*Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices

#### Familia

Lessoniaceae

Atentamente,

Mercedes Flores Pimentel  
Jefe  
Herbario “A. Weberbauer” (MOL)  
Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



## Anexo 2. Medio RPMI-1640 Base

Para preparar 100 mL de medio RPMI-1640 base, mezclar los siguientes componentes:

Antibióticos.....1 mL  
 Aminoácidos no esenciales.....1 mL  
 Bicarbonato de sodio.....2.6 mL  
 Medio RPMI-1640 (pH 7,0).....csp 100 mL

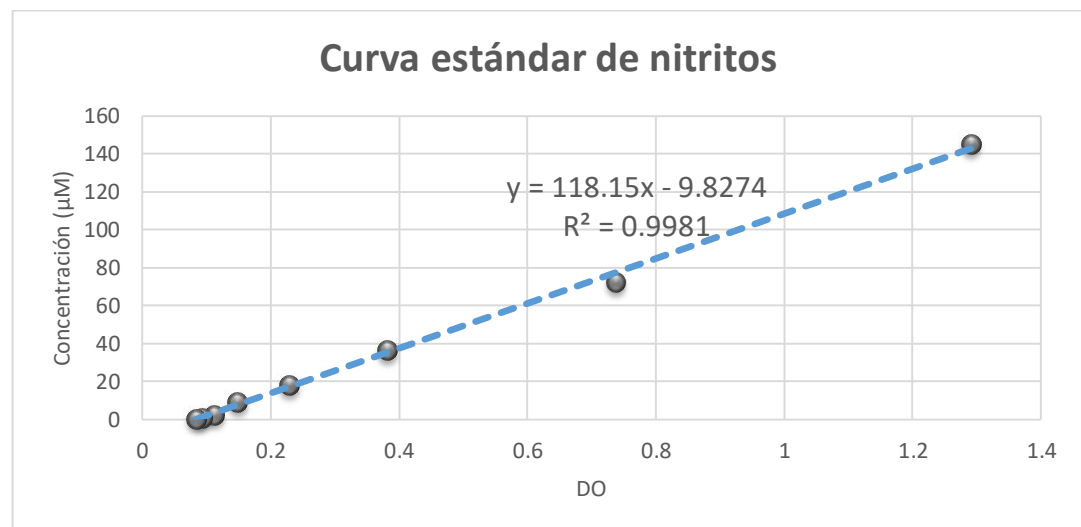
## Anexo 3. NBT 5 µg/µL

Para preparar 10 mL de NBT stock disuelva los siguientes componentes:

NBT..... 0.05 g  
 Solución de Hanks (pH 7,0).....10 mL

Luego la solución de NBT fue esterilizada con un filtro de 0.2 µm.

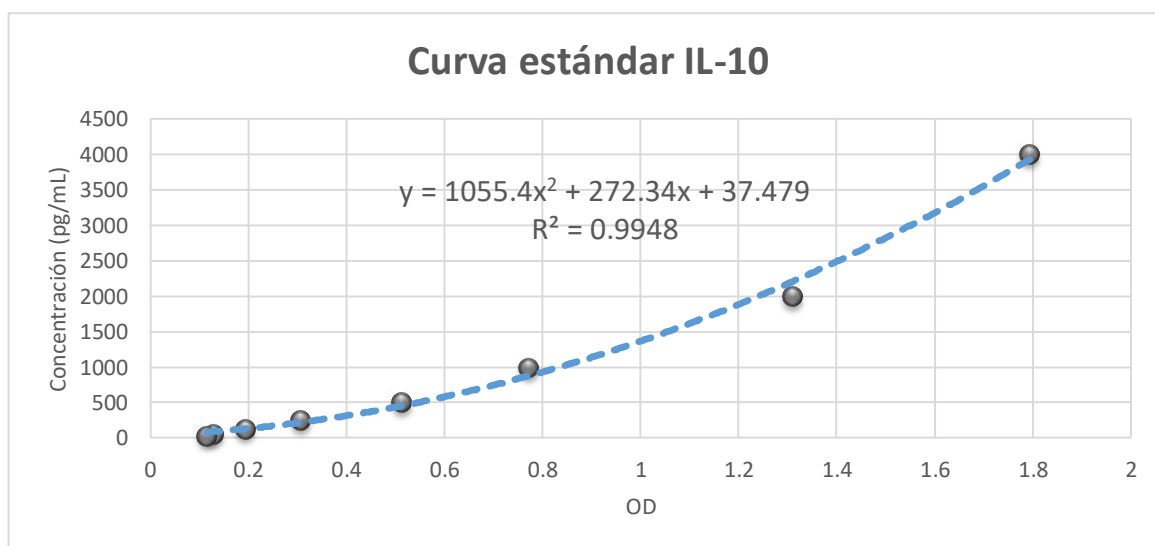
## Anexo 4. Curva de calibración para la estimación de la producción de nitritos



## Anexo 5. Títulos de anticuerpos expresados como el Log<sub>4</sub> de la máxima dilución positiva.

	Tratamientos											
	G1			G2			G3			G4		
RIP	4	4	4	3	3	3	5	5	5	4	0	3
RIS	5	5	4	5	5	4	5	6	4	5	5	4

## Anexo 6. Curva estándar para estimación de la concentración de IL-10 en suero.



## Anexo 7. Buffer Tris base-Ácido Bórico-EDTA 10x (TBE 10X)

Para preparar 1 L de TBE 10X disuelva los siguientes componentes en 600 mL de agua desionizada:

Tris Base (FW = 121).....108 g  
 Ácido bórico (FW = 61.8).....55 g  
 EDTA 0,5 M (pH 8,0).....40 mL  
 Agua desionizada.....csp 1 L

Para preparar una solución de trabajo 1X a partir de 10X stock buffer, diluir el tampón 10X con agua desionizada o tridestilada hasta 1X.

## Anexo 8. Tabla de resumen de resultados

Se indican los resultados de los grupos tratados con fucoidan de *L.trabeculata* teniendo como **referencia** al grupo tratado con *F.vesiculosus*. Los valores indicados representan unidades arbitrarias pero proporcionales a las diferencias.

Valor positivo: mayor, 0: no diferencia, y negativo: menor

Fucoidan <i>L.trabeculata</i> vs <i>F.vesiculosus</i> (RIP)						
Inmunidad Innata			Inmunidad Adaptativa Humoral			
	ERO	ERN	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10
G1	8	14	6	5	3	5
G2	7	30	3	4	2	4

	Fucoïdan <i>L.trabeculata</i> vs <i>F.vesiculosus</i> (RIS)							
	Respuesta Inmune Celular				Inmunidad Adaptativa Humoral			
	Inmunidad Innata		Fagocitosis					
	ERO	ERN	Actividad Fagocítica	Índice Fagocítico.	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10
G1	0	5	0	0	0	0	1	0
G2	0	14	0	0	1	-4	2	-2